XXIII Ciclo del Dottorato di Ricerca in

Metodologie di Biomonitoraggio dell'Alterazione Ambientale

Fitorimedio di Idrocarburi Policiclici Aromatici

Studi di Rizodegradazione e Biodisponibilità

Settore Scientifico Disciplinare: CHIM/12

Dottoranda

Michela Sesso

Coordinatore del Dottorato

prof. Pierluigi Nimis

Relatore

dr. Pierluigi Barbieri

Anno Accademico 2009/2010

Indice

Indice delle figure

Indice delle tabelle

Abbreviazioni

ANOVA	Analysis of Variance
ARPA	Agenzia per la Protezione dell'Ambiente
ASE	Accelerated Solvent Extraction
B[a]A	Benzo[a]antracene
B[a]P	Benzo[a]pirene
B[b+k]F	Benzo[b+k]fluorantene
B[g,h,i]P	Benzo[g,h,i]perilene
B_C	Biomass Carbon
BTEX	Benzene, toluene, etilene, xilene
C	Crisene
C_B	Carbonio microbico
CIGRA	Centro di Gestione e Recupero Ambientale
CSC	Capacità di scambio cationico
CSC	Concentrazione Soglia di Contaminazione
CSR	Concentrazione Soglia di Rischio
D.Lgs.	Decreto Legislativo
D.M.	Decreto Ministeriale
D[a,h]A	Dibenzo[a,h]antracene
DOC	Dissolved Organic Carbon
DPI	Dispositivi personali di sicurezza
EEA	European Environmental Agency
EPA	Environmental Protection Agency
ET	Evapotraspirazione
FDA	Fluoresceina Diacetato
GC–MS	Gascromatografia Spettrometria di Massa
I[1,2,3-cd]P	Indeno[1,2,3-cd]pirene
IARC	International Agency for the Research on Cancer
IG%	Indice di germinazione percentuale
IPA–D	Idrocarburi Policiclici Aromatici Deuterati
IPA	Idrocarburi Policiclici Aromatici
ISO	International Organization for Standardization
ISSS	Intenational Society of Soil Science
ITRC	Interstate Technology and Regulatory Council
K_{ow}	Coefficiente di ripartizione acqua – ottanolo
LAI	Leaf Area Index
LD	Laser Diffraction
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MISE	Messa in Sicurezza d'Emergenza
MISO	Messa in Sicurezza Operativa
MISP	Messa in Sicurezza Permanente
OPP	Ospedale Psichiatrico Provinciale

P	Pirene
PAH	Polyciclic Aromatic Hydrocarbon
PCB	Policlorobifenili
PET	Polietilentereftalato
Pirene–D	Pirene Deuterato
ppm	Parti per milione
prot.	Protocollo
rpm	revolutions per minute
S.I.	Sistema Interno
s.m.i.	Seguenti modifiche e/o integrazioni
S.O.	Sostanza organica
SIM	Single Ion Monitoring
SIN	Sito di Interesse Nazionale
SPE	Solid Phase Extraction
St	Standard
sVOC	Semi-Volatile Organic Compounds
Tab.	Tabella
TEC	Tricloroetilene
TIC	Total Ion Counter
TOC	Total Organic Carbon
US-EPA	United States – Environmental Protection Agency
USDA	United States Department of Agriculture
UV–vis	Ultraviolet – visible spectroscopy
v.	Vedi
WHC	Water Holding Capacity

Premessa e scopo della tesi

Questo studio nasce idealmente vent'anni fa, quando il Prof. Pier Paolo Puglisi, genetista dell'Università di Parma e uomo di estrema cultura e lungimiranza discute allora il tema del fitorimedio come possibilità di risolvere stati alterati dell'ambiente. In uno dei suoi scritti, *1789 – 1989 Abbiamo preso la Bastiglia disinquiniamola*, si legge:

> *[...] le piante "accumulano disagio ambientale", ma vi sopravvivono, esse non sono capaci di dire come stanno le cose, ma di predirne come saranno, se non saranno messi in opera quegli opportuni strumenti che, deviando percorsi, producendo schemi di intervento su schemi di combustione, attenzione alle qualità degli scarichi, possano prevenire quegli autunni troppo precoci, o le primavere troppo brevi o permettere ai semi di diventare snelle piantine trasparenti.*

Il Prof. Puglisi descrive nel testo di piante sì come "sentinelle" ambientali, ma anche piante come soluzioni a problemi rilevanti determinati dall'impatto antropico.

È a seguito della lettura del succitato testo che prende inizio questo studio articolato su diversi piani di ricerca, tutti volti a descrivere e cercare delle possibili indicazioni per la risoluzione di un problema di contaminazione pregressa. Il sito che ha fornito il materiale per svolgere le sperimentazioni è inserito nel parco che ha ospitato la principale struttura psichiatrica di Trieste, oggi fortemente usufruita e di interesse collettivo, e considerata polo culturale e dinamico. Su questo sito sorgono dipartimenti universitari, strutture ospedaliere e della pubblica amministrazione. Un'area di questo parco è stata oggetto di contaminazione a seguito dello sversamento di residui di combustione da impianti termici e inceneritori per molte decine d'anni.

Lo scopo del presente lavoro è stato valutare l'applicabilità della pratica del fitorimedio per la mitigazione della contaminazione invecchiata e cronicizzata nel contesto del parco.

Si è inteso affrontare uno studio in pieno campo per testare l'efficacia di due specie erbacee, *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L. nella rizodegradazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA), in un'area moderatamente contaminata.

In secondo luogo si è voluto realizzare una sperimentazione con *Medicago sativa* L. in condizioni maggiormente controllate, riducendo la scala sperimentale e lavorando in serra, ma affrontando un maggiore livello di contaminazione.

Essendo nota la scarsa biodisponibilità degli IPA, in una terza parte della tesi si è mirato a verificare se una contaminazione difficilmente aggredibile dalle tecniche di rizodegradazione, possa essere bioaccumulata e mobilizzata da organismi viventi, impiegando un animale che tipicamente si nutre ingerendo il suolo. Nella sperimentazione sono stati impiegati lombrichi della specie *Eisenia andrei,* facilmente allevabili e reperibili commercialmente.

Questi diversi approcci alla valutazione delle interazioni tra organismi viventi, contaminanti e comparti ambientali mirano a sviluppare una conoscenza che consenta di mitigare la contaminazione del suolo, risorsa non rinnovabile ed estremamente preziosa, con metodi sostenibili, *in situ*, quali ad esempio il fitorimedio; si mira anche a conseguire elementi per valutazioni associate al trasferimento dei contaminanti nell'ambiente che tengano conto non soltanto della tutela della specie umana, ma anche altri organismi, nel contesto di una analisi di rischio ecologico.

1. Introduzione

Il 22 settembre 2006 la Commissione Europea ha adottato la Strategia Tematica sui Suoli [COM (2006) 231] ed una proposta per una Direttiva quadro sui suoli [COM (2006) 232] con l'obiettivo di proteggere i suoli nell'Unione Europea; la proposta tuttavia non è stata ancora approvata. (Commissione delle Comunità Europee, 2006)

In questa proposta il suolo viene definito come *una risorsa non rinnovabile, un sistema dinamico che svolge funzioni e fornisce servizi fondamentali alle attività umane ed alla vita degli ecosistemi. Dalle informazioni, ad oggi, disponibili emerge che, negli ultimi decenni, si è registrato un aumento significativo dei processi di degrado dei suoli e verosimilmente, senza la presenza di adeguati interventi volti a mitigare il succitato degrado, le previsioni non risultano affatto rosee. Ci sono elementi che confermano che, in assenza di interventi, tali processi continueranno ad aumentare.* La qualità del suolo determina l'esistenza delle piante, la capacità di sostenere la vita animale e il genere umano. Le società moderne, formate da uomini e donne in costante movimento, diventano sempre più urbanizzate e la gente conserva sempre di meno un contatto con il suolo che calpesta ogni giorno, dimenticando l'importanza dello stesso e che dalla cui cura, dipende la salvaguardia sia ambientale sia umana.

Essendo l'ecosistema mondiale strettamente interconnesso, la domanda di spazio, la disponibilità di terre, lo sfruttamento del suolo è in stretta relazione con una popolazione globale in forte aumento. Il *Bureaux of Census*, Dipartimento dello *United States Department of Commerce* è l'istituto che si occupa di censire la popolazione mondiale ogni dieci anni. Nelle ultime stime da esso effettuate, la popolazione mondiale attualmente stimata risulta essere di 6.873.000.000, dato in costante aumento. Apparendo evidente che l'aumento demografico porta una diminuzione della disponibilità del suolo, risulta necessario migliorare la comprensione e la gestione del suolo per garantire alle generazioni future la possibilità di usufruire di questo bene indispensabile per la vita.

1.1. Le funzioni del suolo

L'uomo dipende strettamente dalle funzioni del suolo. Un suolo sano è in grado di fornirci aria, acqua pulite, colture abbondanti, flora e fauna.
Essenzialmente il suolo svolge cinque grandi funzioni:

1. Ciclo dei nutrienti – il suolo immagazzina, dosa il rilascio e governa il ciclo di sostanze nutritive e altri elementi. Durante i processi biochimici, in analogia con il ciclo dell'acqua, le sostanze nutritive possono essere trasformate in forme disponibili per i vegetali, trattenute nel terreno o immesse nell'aria o nell'acqua.
2. Regolazione delle acque – il suolo condiziona i flussi di acqua e soluti, con la possibilità di stoccarli e regolarne la velocità, in dipendenza della sua capacità di ritenzione idrica. Grazie ad un corretto funzionamento, l'acqua viene adeguatamente distribuita tra le falde acquifere e la quota necessaria per la sopravvivenza di piante e animali.
3. Biodiversità e habitat – il suolo supporta la crescita di piante superiori fornendo un mezzo per l'ancoraggio degli apparati radicali e fornisce elementi nutritivi che sono essenziali per l'intero sistema vegetale. Le proprietà del suolo spesso determinano la presenza di elementi vegetazionali e indirettamente il numero e il tipo di animali (incluso l'uomo).
4. Filtraggio e Buffering – il suolo funziona come un sistema naturale di riciclo. Al suo interno, i prodotti di scarto, piante e animali deceduti sono assimilati e i loro elementi base vengono reimpiegati per nuove generazioni.
5. Stabilità fisica e sostegno – il suolo ha la capacità di mantenere la sua struttura porosa per consentire il passaggio di acqua e aria, resistere a processi erosivi e fornire un supporto per gli apparati radicali delle piante. Inoltre il terreno è in grado di dar sostegno e ancoraggio alle opere umane (Brady & Weil, 2008).

Il suolo è sottoposto a continue e sempre più incalzanti pressioni ambientali, determinate in gran parte dalle attività antropiche, come le pratiche agricole e silvicole inappropriate, l'industrializzazione, l'urbanizzazione, il turismo. Tutte queste attività danneggiano il suo naturale mantenimento e la sua capacità di svolgere le funzioni sopra elencate.

Considerare la qualità del suolo significa osservare i cambiamenti che su di esso avvengono in seguito alle pressioni che subisce. Lo scopo di valutarne la qualità è quello di ottenere informazioni utili per tutelare e migliorare a lungo termine la produttività agricola, la qualità delle acque e degli habitat per garantire a tutti gli organismi la sopravvivenza, ma anche per tutelare la salute pubblica.

Quanto detto sopra mette in evidenza un comportamento umano che per anni è stato alla base della normale visione delle cose; la natura, per una concezione arcaica e assolutamente priva di riscontri pratici, è da sempre stata considerata indistruttibile e autogenerante, a differenza, ad esempio del capitale di cui si sottintende invece il naturale deterioramento attraverso sistemi di contabilità che misurano l'entità del deprezzamento. La natura è dunque considerata generosa e praticamente inesauribile, una sorta di cornucopia di risorse che non finiscono mai (Tiezzi & Marchettini, 1999). La direzione che dobbiamo prendere è quella di valorizzare la risorsa suolo e di diffondere il valore che questa detiene, al fine di invalidare al più presto l'assunzione appena espressa; ne va della sopravvivenza della specie.

1.2. Lo stato delle conoscenze sulla contaminazione del suolo

L'abuso o l'uso non ponderato della risorsa suolo ha portato a delle conseguenze negative in termini di qualità dell'ambiente. Numerose sono le evidenze dei siti contaminati a livello europeo, nazionale e regionale.

In tutte le superfici industrializzate, la contaminazione di suolo e sottosuolo è considerata un'emergenza rilevante. Secondo *European Environmental Agency* (EEA), il numero di siti contaminati che necessitano di un intervento di bonifica nei paesi dell'Unione Europea sono 250.000 (Boni, Collivignarelli, & Vagliasindi, 2011).

In Italia, secondo dati del Ministero dell'Ambiente (2007), i siti potenzialmente contaminati sono 13.000. Attualmente le aree riconosciute come Siti Inquinati di Interesse Nazionale

(SIN) sono 57, per un'estensione complessiva di circa 800.000 ettari di suolo a terra e 340.000 a mare. Nella Regione Friuli Venezia Giulia, al 31 dicembre 2005 le procedure attive ai sensi del D.M. 471/99 per siti contaminati sono 345 l'incremento medio per il periodo 2002 – 2005 è stato di 80 casi all'anno.

Dinanzi a dati così eclatanti, appare evidente quanto sia complessa, ma al tempo stesso necessaria, un'opera di intervento a tutela della salute umana e del suo ambiente.

Le risorse economiche richieste in campo sono difficilmente quantificabili. Risulta necessario quindi affrontare la problematica del risanamento in un'ottica interdisciplinare che sappia interconnettere le molteplici competenze, al fine di poter praticare la miglior scelta possibile.

1.3. Evoluzione della normativa a tutela del suolo

Il continuo dilagare di situazioni di criticità ha spinto le autorità competenti a varare delle norme specifiche in materia di gestione di siti contaminati. L'Italia si è dotata col D.Lgs. del 15 febbraio 1997 n° 22 (Decreto Ronchi), di specifiche leggi sul tema dei rifiuti; all'articolo 17 si stabilivano i criteri generali per gestire in modo organico la criticità della bonifica dei siti contaminati. Gli approcci tecnici vengono affrontati dal D.M. n° 471 del 25 ottobre 1999 *Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti contaminati.* Il D.M. 471/99 ha stabilito termini come sito potenzialmente inquinato, sito inquinato, ripristino ambientale, messa in sicurezza, messa in sicurezza permanente, inoltre ha determinato dei livelli di contaminazione delle sostanze inquinanti e fornito delle indicazioni riguardo il campionamento, la conservazione del campione e il compimento delle analisi. Al contempo sono state date delle linee guida per la stesura di progetti, secondo tre livelli di approfondimento tecnico:

- piano di caratterizzazione;
- progetto preliminare;
- progetto definitivo.

Non poche sono state le difficoltà incontrate dagli operatori in campo ambientale nell'applicazione delle norme. Nel D.Lgs. 152/2006, riconosciuto come Testo Unico Ambientale, sono stati modificati alcuni concetti, ponendo l'attenzione non più solo sulla tutela ambientale ma anche sulle conseguenze che la contaminazione può arrecare all'uomo.

Sono state corrette alcune concentrazioni limite ammissibili del D.M. 471/99, introducendo così il concetto di Concentrazione Soglia di Contaminazione (CSC).

Il superamento delle CSC obbliga il proprietario del sito alla caratterizzazione, operazione questa che porta alla stesura dell'analisi di rischio sito–specifica, necessaria per giungere alla distinzione tra sito non contaminato e sito potenzialmente contaminato.

L'analisi di rischio sito–specifica diventa uno strumento decisionale, elemento imprescindibile di conoscenza oggettiva del luogo e, pertanto, delle operazioni che su di esso debbono essere compiute, siano queste di bonifica o di messa in sicurezza. Il raggiungimento di un valore inferiore alle Concentrazioni Soglia di Rischio (CSR), da determinare caso per caso con l'applicazione della procedura di analisi di rischio, diventa l'obiettivo dell'opera di bonifica.

Inoltre, Il D.Lgs. 152/2006 introduce anche un'altra operazione, quest'ultima da eseguire al momento stesso in cui si verifichi l'emergenza, la Messa in Sicurezza Operativa (MISO); questo intervento segue le indicazioni date dal D.M. 471/99 che distingueva tra Messa in Sicurezza d'Emergenza (MISE), Messa in Sicurezza Permanente (MISP). La MISO è rivolta agli interventi da effettuare in via transitoria in attesa di eventuali ulteriori interventi da realizzarsi alla cessione dell'attività del sito, predisponendo piani di monitoraggio.

1.4. Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA)

Particolare attenzione durante questo studio è stata data agli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sostanze ubiquitarie generate da risorse naturali o antropogeniche (Liu, Luo, Cao, Wu, & Ding, 2004). La loro formazione può avvenire in seguito ad una combustione incompleta di materiali organici, come carbone, petrolio, gas, rifiuti o altre sostanze organiche. Oltre che a queste tipologie di immissioni, gli IPA possono anche venir immessi nell'ambiente in seguito

ad esalazioni vulcaniche, incendi boschivi, combustione di carbone o scarico delle automobili.

Le molecole di IPA sono costituite da due o più anelli aromatici condensati, fusi tra loro attraverso una coppia di atomi di carbonio condivisi. La collocazione degli anelli può dare forme lineari, angolari o a cluster.

Gli IPA generalmente hanno elevati punti di fusione ed ebollizione, e bassi valori di tensione di vapore. Hanno una bassa solubilità in acqua, poiché sono molecole lipofile, e sono chimicamente piuttosto inerti (Bulder, Hoogenboom, Kan, van Raamsdonk, Traag, & Bouwmeester, 2006).

A seconda delle loro proprietà fisiche e chimiche si possono dividere in due gruppi: IPA a basso peso molecolare, contenenti due o tre anelli aromatici, ed IPA ad alto peso molecolare, contenenti più di tre anelli aromatici. Questi composti possono avere uno o più gruppi sostituiti agli anelli aromatici, cambiandone le proprietà e spesso alterandone l'effetto tossico (Irwin, 1997).

Considerata l'elevata idrofobicità, gli IPA tendono ad interagire con le fasi non acquose e la sostanza organica del suolo, diventando potenzialmente disponibili per la degradazione microbica. Poiché la solubilità in acqua diminuisce in modo approssimativo logaritmicamente con l'aumentare della massa molecolare, gli IPA con alto peso molecolare, indicativamente composti da cinque a sette anelli aromatici, destano particolare preoccupazione, in considerazione della bioaccumulabilità; i composti più pesanti hanno tale affinità per le componenti organiche del suolo che tendono a rimanere adese ad esso ed a non esser mobilizzati. La letteratura riporta studi (Johnsen, Wick, & Harms, 2005) in riferimento ai fattori che influenzano la degradazione microbica nel caso di IPA scarsamente biodisponibili, evidenziando l'ampiezza di studi condotti in condizioni controllate di laboratorio e la scarsità di studi in condizioni reali (Johnsen, Wick, & Harms, 2005).

Tabella 1.1 - Proprietà chimico fisiche 16 IPA definiti *"priority pollutants"*

IPA	Massa molare (g/mol)	Solubilità a 25°C (μg/l)	Pressione di vapore a 25°C (atm)	Log Kow (Log Koc)	Cancerogenicità (IARC, 1983)	Anelli benzenici (anelli totali)
Benzo[a]pirene	252.3	3.8	5.5×10^{-9}	6.06 (5.74)	1	5
Dibenzo[a,h]antracene	278.3	0.4		6.86 (6.52)	2A	5
Benzo[a]antracene	228.3	11.0	1.1×10^{-7}	5.63 (5.30)	2B	4
Benzo[b]fluorantene	252.3	2.4		6.04 (5.74)	2B	4(5)
Benzo[k]fluorantene	252.3			-	2B	5
Crisene	228.3	1.9		5.63 (5.30)	2B	4
Indeno[1,2,3-cd]pirene	276.3			6.58 (6.20)	2B	5(6)
Benzo[g,h,i]perilene	276.3	0.3	1.0×10^{-10}	6.78 (6.20)	NC	6
Antracene	178.2	59	2.4×10^{-4}	4.5 (4.15)	NC	3
Acenaftene	154.2			3.98 (3.66)	NC	2
Acenaftilene	152.2	3420	10^{-3}–10^{-4}	4.07 (3.40)	NC	2
Fluorantene	202.3	260		4.90 (4.58)	NC	3(4)
Fluorene	166.2	800		4.18 (3.86)	NC	2(3)
Naftalene	128.2	12500 – 34000	1.8×10^{2}	3.37	NC	2
Fenantrene	178.2	435	6.8×10^{-4}	4.46 (4.15)	NC	3
Pirene	202.1	133	6.9×10^{-7}	4.88 (4.58)	NC	4

NC = non cancerogeno
1 = cancerogeno per l'uomo
2A = cancerogeno probabile per l'uomo
2B = cancerogeno possibile per l'uomo

Nelle matrici ambientali gli IPA sono generalmente rinvenuti in miscela e mai come composti singoli. Ciò rende complessa l'individuazione delle conseguenze sulle salute, essendo possibile a causa di effetti sinergici, che la tossicità della miscela risulti maggiore rispetto alla somma delle tossicità dei singoli composti.

Numerose sono le forme che caratterizzano gli IPA, con proprietà chimico-tossicologiche diverse. L'*International Agency for Research on Cancer* (IARC), ne riconosce e classifica 16 con possibili e probabili caratteristiche cancerogene verso l'uomo, e tra questi il Benzo[a]pirene è l'unico classificato come cancerogeno per l'uomo con effetti dimostrati (IARC, 1983). I principali effetti vengono riscontrati sull'apparato urinario, respiratorio, digestivo e sulla pelle, sia in seguito ad esposizione cronica che accidentale.

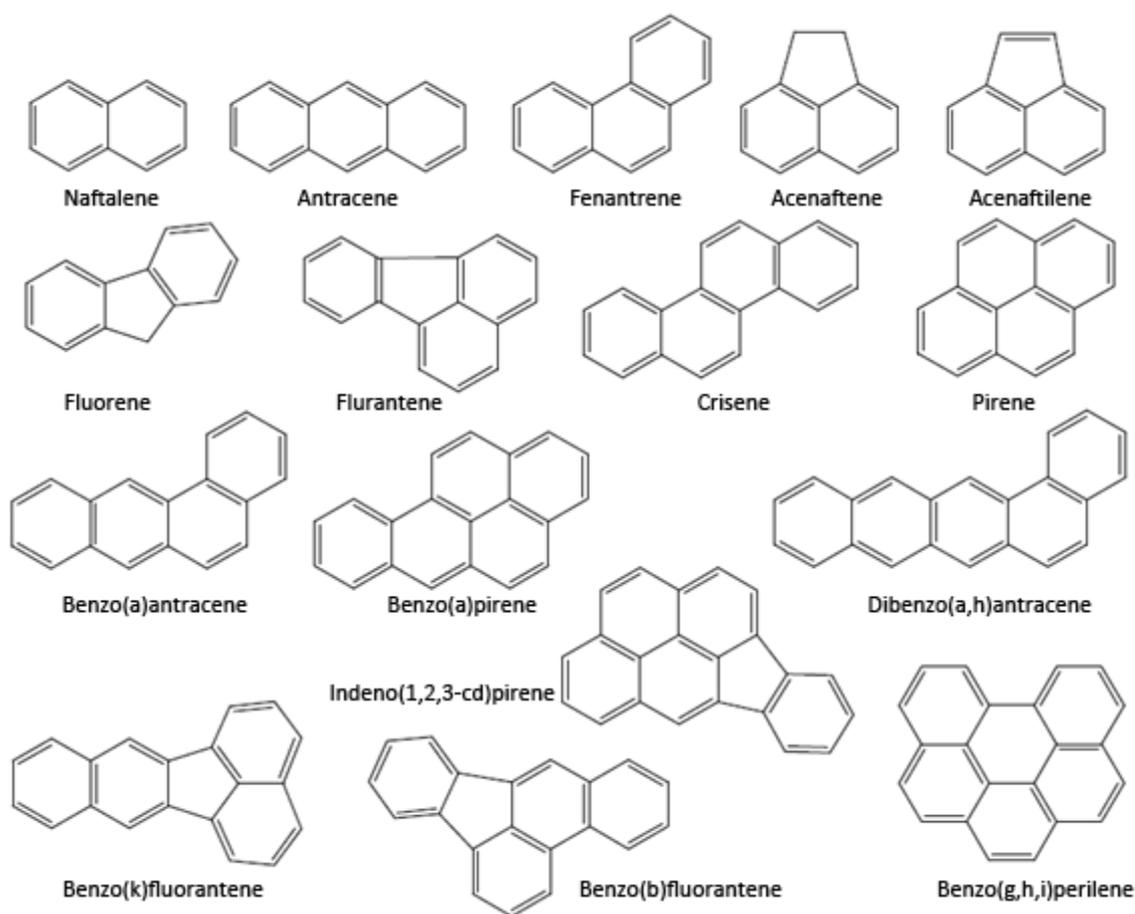



Figura 1.1 - Strutture dei 16 IPA considerati come *"priority pollutants"* dall'EPA

Durante questo studio sono stati impiegati metodi consolidati per la determinazione degli IPA, impiegando il sistema di *Gas Cromatografia* accoppiato ad uno *Spettrometro di Massa* a seguito di estrazione con *Accelerated Solvent Extractor.*

Si è deciso di monitorare solo gli IPA più pesanti, normati nel D.Lgs. 152/2006, per i quali vi sono indicazioni di maggiore tossicità, caratterizzati dall'avere da quattro a sei anelli benzenici. Alle analisi chimiche strumentali si è inoltre deciso di affiancare un saggio di fitotossicità con la finalità di ottenere una valutazione degli effetti sulla germinazione delle piante dell'insieme dei contaminanti idrosolubili presenti nei campioni di suolo, utilizzando il test (UNICHIM, 2003).

I metodi impiegati per la determinazione di questi inquinanti nelle diverse matrici osservate, e il saggio per la valutazione dell'inibizione della germinazione vengono descritti in 2.4.3.Appendice A.

1.5. Introduzione alle pratiche di bonifica

Le pratiche di bonifica di suoli contaminati sono numerose ed affrontano il problema della decontaminazione con metodi diversi e a diversi gradi di efficacia.
I trattamenti di bonifica possono venir suddivisi in:

- trattamenti *in situ*, che vengono condotti direttamente sul sito e non prevedono l'asportazione di terreno,
- trattamenti *on site*, che prevedono l'asportazione della matrice contaminata ed il trattamento generalmente avviene *in loco*,
- trattamenti *off site*, che consistono nel prelievo e trasporto del terreno contaminato in un impianto atto al trattamento.

È possibile raggruppare in tre categorie i processi di bonifica:

1. trattamenti chimico–fisici, come il lavaggio di terreno, l'estrazione elettrocinetica, l'ossidazione e riduzione chimica *in situ*, la stabilizzazione/solidificazione;
2. trattamenti termici, quali il desorbimento termico *in* ed *ex situ*, l'incenerimento, la vetrificazione *in situ*;
3. trattamenti biologici, quali il fitorimedio, la bioventilazione (biopila), *land farming*.

Nel caso di trattamenti *in situ*, la scelta di una data tecnologia è dipendente da molteplici fattori, quali le caratteristiche chimico–fisiche del suolo, la granulometria del terreno, il pH, il contenuto di sostanza organica, l'omogeneità e la permeabilità della matrice.
Un altro fattore essenziale per la scelta della pratica di bonifica è la tipologia di contaminazione. A volte la presenza di contaminazione complessa (quindi presenza di contaminanti organici ed inorganici), condizione frequente nei siti contaminati, spinge gli operatori ambientali a scegliere più tecniche di bonifica, applicate in sequenza con un conseguente aumento dei costi complessivi dell'intervento di ripristino ambientale.

Inoltre è fondamentale considerare la concentrazione della contaminazione. Ad esempio, nel caso si scelga di operare con un trattamento a biopile, una concentrazione di idrocarburi totali superiore a 50.000 mg/kg_{ss} può portare ad un'inibizione dell'attività degradativa batterica (Collivignarelli & Vaccari, 2011). Allo stesso modo, nel caso che si operi con piante, considerare i livelli di contaminazione iniziale è essenziale, in quanto si potrebbero verificare fenomeni di tossicità e portare i vegetali a situazioni di forte stress che inibisce l'efficacia del sistema biologico o ancor peggio alla morte.

Le principali caratteristiche chimico–fisiche che influenzano l'assorbimento potenziale di contaminanti organici nella pianta sono: idrofobicità, polarità, proprietà di adsorbimento e solubilità. Il coefficiente di ripartizione acqua–ottanolo è un parametro che può fornire una valutazione complessiva delle caratteristiche sopra citate.

Posta una sostanza in una miscela di n-ottanolo e acqua, il coefficiente di ripartizione è definito come segue:

$$\log K_{ow} = \log [S]_{ott}/[S]_{aq}$$

$[S]_{ott}$ = concentrazione sostanza in n-ottanolo
$[S]_{aq}$ = concentrazione sostanza in acqua

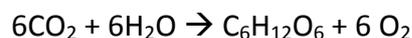
Dalla conoscenza del $\log K_{ow}$ di in dato inquinante è possibile prevedere come quest'ultimo si ripartisca tra la sostanza organica e l'acqua presenti nel suolo (Collivignarelli & Vaccari, 2011).

Nel caso in cui si tratti una matrice contaminata con la tecnologia del fitorimedio, il prelievo di composti idrofilici ($\log K_{ow} < 1.0$) è molto basso, in quanto non risultano disponibili considerati i forti legami instaurati con le particelle del suolo, inoltre composti fortemente idrofobici ($\log K_{ow} > 3.5$) non sono disponibili a causa dell'incapacità di oltrepassare il doppio strato lipidico dell'apparato radicale in cui rimangono confinati. I composti a idrofobicità intermedia ($\log K_{ow}$ da 1.0 a 3.5), sono capaci di solubilizzarsi in acqua e quindi si rendono biodisponibili per il prelievo tramite le radici e la traslocazione nelle parti aeree (Briggs, Bromilow, & Evans, 1982).

La scelta della tecnologia di bonifica deve avvenire nel rispetto delle istruzioni fornite dal D.Lgs. 152/2006 e s.m.i. il quale dice che sono da privilegiare *tecniche di bonifica che riducono permanentemente e significativamente la concentrazione delle diverse matrici ambientali, gli effetti tossici e la mobilità delle sostanze inquinanti.* Inoltre il decreto enuncia che sono da *privilegiare le tecniche di bonifica tendenti a trattare e riutilizzare il suolo nel sito mediante trattamenti in situ e on site, con conseguente riduzione dei rischi derivanti dal trasporto e messa in discarica del terreno inquinato.*
È anche sulla base delle succitate considerazioni che si basa la scelta di questa esperienza di Dottorato, che vede applicata la pratica del fitorimedio come risposta alla necessità di operare *in situ* in una situazione di contaminazione a tratti complessa.

1.6. Concetti base di fisiologia vegetale

In questo capitolo vengono introdotte alcune reazioni che tipicamente avvengono tra la pianta ed il suolo, reazioni che normalmente sono coinvolte e determinanti nella pratica del fitorimedio.
Tipicamente le piante si accrescono penetrando le proprie radici nel suolo e producendo elementi funzionali quali foglie e fusto. Per poter garantire una crescita di base, le piante usano l'energia solare per organicare il carbonio (Taiz & Zeiger, 1991).
La sintesi di sostanze organiche, che avviene a partire da precursori inorganici con l'aiuto della luce, va sotto il nome di fotosintesi, che è un processo caratterizzato da una seria di reazioni chimiche il cui bilancio netto è rappresentato dalla seguente equazione (Longo & Marzani, 2005):

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2$$

Le piante prelevano dal suolo l'acqua e i nutrienti inorganici disciolti attraverso il sistema radicale. Questa soluzione viene trasportata attraverso il sistema xilematico in tutti i comparti della pianta; ora, mentre i nutrienti vengono impiegati nei vari processi vitali, l'acqua viene traspirata attraverso le foglie sotto forma di vapore acqueo.

Allo stesso modo i prodotti fotosintetici sono trasportati attraverso il floema in tutta la pianta. Il trasporto delle sostanze verso l'alto ad opera dello xilema e verso il basso attraverso il floema viene definito *traslocazione,* meccanismo che dipende dalla colonna d'acqua continua che è presente in tutta a pianta.

Ognuno di questi processi biologici può contribuire al risanamento di ambienti alterati o al contenimento dei contaminanti.

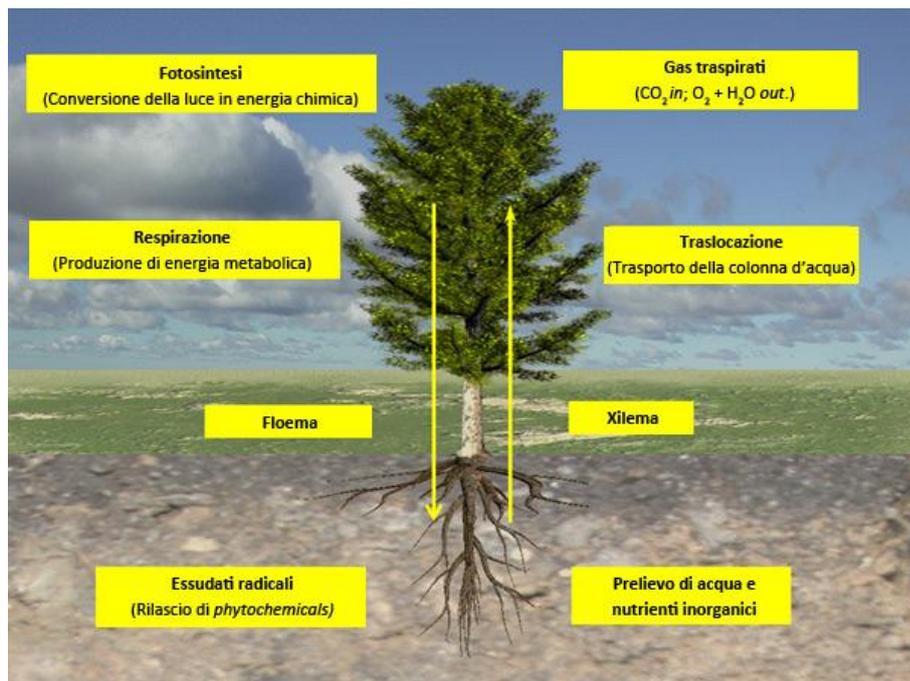



Figura 1.2 - Processi fisiologici attuati dalla pianta (tradotto da ITRC, 2009)

1.7. Nutrizione inorganica

I tredici nutrienti inorganici essenziali (N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cl, Zn, Mn, Cu, B, e Mo) sono prelevati dal sistema radicale sotto forma di sostanze disciolte nella frazione umida del suolo. Questi elementi sono indispensabili per far crescere le piante, farle sviluppare e permetterne la riproduzione. Gli elementi sopraelencati, vengono immessi nella pianta in modo passivo, attraverso la traspirazione, o in modo attivo attraverso il proteine di trasporto associate alla membrana delle radici.

Arrivati all'interno del sistema radicale, i nutrienti disciolti possono venir trasportati in tutto il resto della pianta attraverso il sistema vascolare (xilema). Vi sono altri nutrienti non essenziali che, se presenti nel suolo a concentrazioni superiori a determinate soglie, vengono considerati come contaminanti (sali, Pb, Cd, As, etc.) e questi possono ugualmente venir assorbiti dalla piante; anche in questo caso, il processo di assorbimento può essere passivo o attivo.
Questi processi sono gli stessi che osserviamo nel meccanismo di fitoestrazione.
Dato che questi ultimi elementi non sono essenziali per la pianta, la loro presenza può determinare un potenziale tossico che dipende dalla sensibilità della stessa.
La pianta dispone anche di vari meccanismi per sequestrare o stabilizzare queste sostanze inorganiche estranee ed impedirne il trasporto nei tessuti più sensibili della pianta. Tali meccanismi sono rappresentati nei processi di fitosequestrazione e in alcuni processi di fitostabilizzazione.

1.8. Evapotraspirazione

L'Evapotraspirazione (ET) è una grandezza fisica usata in agrometeorologia che viene definita come la quantità d'acqua (riferita all'unità di tempo) che dal terreno passa in atmosfera allo stato di vapore per effetto della traspirazione ad opera delle piante e dell'evaporazione diretta dal terreno. Questi processi fanno parte dei meccanismi di fitoidraulica, che verranno descritti in seguito.
Il processo di evapotraspirazione (Figura 1.3) viene influenzato in modo determinante dalla vegetazione che è in grado di captare una quota d'acqua attraverso l'apparato fogliare e intercettare ciò che viene trasferito nel suolo grazie al sistema radicale, per poi trasferirla in atmosfera (Viessman, Lewis, & Knapp, 1989).

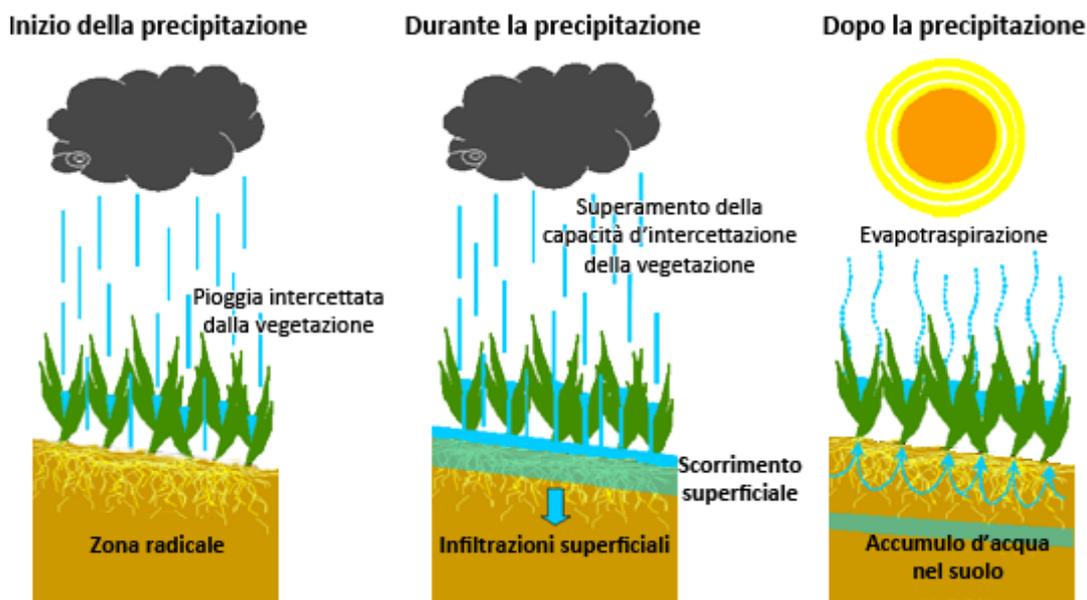



Figura 1.3 - Processi ad opera della copertura vegetale (Evapotraspirazione e Fitostabilizzazione). Si osservano fenomeni di controllo di infiltrazioni. (tradotto da ITRC, 2009)

Tale meccanismo riduce la quantità di infiltrazione e può limitare il riempimento delle falda idrica sotterranea. Le differenze di capacità di intercettazione delle acque piovane sono dovute a fattori morfologici della parte epigea della pianta, ossia, la struttura (portamento orizzontale, verticale, profilo), la superficie fogliare (presenza di peli o cere), e la densità (numero di rami e foglie). Un fattore chiave è *l'indice di area fogliare* (*Leaf Area Index* - LAI), che esprime l'area totale di una faccia del tessuto fotosintetizzante per unità di superficie di terreno. Se l'acqua piovana non intercettata dalla pianta riesce ad infiltrarsi nel terreno, è soggetta a processi di captazione/traspirazione da parte del sistema radicale e rimane disponibile per ricaricare la falda freatica. Anche altri fattori, come ad esempio lo stato di salute delle piante, hanno un impatto sulla capacità di traspirazione.

1.9. La rizosfera

Si è voluto in questo breve capitolo approfondire il concetto di rizosfera, tale puntualizzazione si rende necessaria in considerazione del fatto che nei capitoli successivi il concetto verrà richiamato frequentemente. Dal punto di vista spaziale, la rizosfera è definita come i pochi millimetri di suolo che circondano le radici della pianta e che sono influenzati

dalla loro attività. Il confine tra la rizosfera e la grande massa di suolo (*bulk soil*) è di difficile individuazione (Zerbi & Marchiol, 2004).

Gli essudati radicali provvedono al nutrimento dei microrganismi che vivono in questa porzione di spazio, definendo dinamiche di competizione tra questi, per l'ottenimento delle risorse nutritive.

In genere, batteri azoto fissatori e funghi micorrizici migliorano la crescita e la sopravvivenza della pianta a differenza di funghi patogeni e organismi come ad esempio i nematodi che possono vivere a scapito di questa (Pugnaire & Vallandares, 2007).

La rizosfera non possiede, come abbiamo appena visto, dei confini esatti. Basti considerare l'estensione delle ife fungine che vivono nel terreno ma penetrano anche nelle cellule corticali esterne delle radici, (Russel, 1986) o l'impossibilità di tracciare una netta linea di demarcazione tra il suolo e l'apparato radicale.

Le caratteristiche del suolo (tessitura, pH, densità, etc.), le proprietà del sistema radicale, lo stato nutrizionale della pianta, le condizioni climatiche (umidità, temperatura, etc.) possono ulteriormente influenzare il volume della rizosfera.

Dal punto di vista funzionale, la rizosfera può essere definita come un micro–ambiente altamente dinamico, sostenuto dall'energia solare e dalle piante, caratterizzato da processi di *feedback* tra l'attività radicale, le caratteristiche del suolo e la dinamica della popolazione microbica associata (Zerbi & Marchiol, 2004).

1.10. Il fitorimedio

1.10.1. Caratteristiche chimico – fisiche del terreno

Il nostro studio ha impiegato metodi consolidati per la caratterizzazione dei suoli e per la valutazione dell'accumulo di inquinanti nel biota. Questi parametri hanno un'influenza molto rilevante sulla pratica del fitorimedio.

In particolare si sono determinati per i suoli:

- pH (Violante, Sequi, 2000. Metodo III.1);
- capacità di scambio cationica(Violante, Sequi, 2000. Metodo XIII.2);
- granulometria (granulometro laser Malvern);
- capacità di ritenzione idrica;
- carbonio organico e azoto totale (Violante e Sequi, 2000; Metodo VII.1);
- sostanza organica;
- biomassa microbica (Alef & Nannipieri, 1995);
- quoziente microbico;
- attività enzimatica (Alef & Nannipieri, 1995).

La descrizione dei metodi usati per la determinazione di parametri viene riportata in 2.4.3.Appendice A.

1.10.1.1. Il pH

La reazione del suolo, acida, neutra o alcalina è espressa dal valore di pH, definito come il logaritmo negativo in base 10 della concentrazione in moli · L^{-1} di ioni H^{+} nella fase liquida.
Il pH è in grado di influenzare le reazioni del suolo e la produzione vegetale.
Ad esempio:

- l’aumento dell’acidità del suolo diminuisce lo sviluppo delle popolazioni batteriche;
- in suoli altamente alcalini si ha l’insolubilità di ferro, rame e manganese;
- il pH è in grado di agire sulle caratteristiche chimiche-fisiche del sistema suolo (dispersione dei costituenti argillosi, compattazione del suolo, permeabilità dell’acqua).

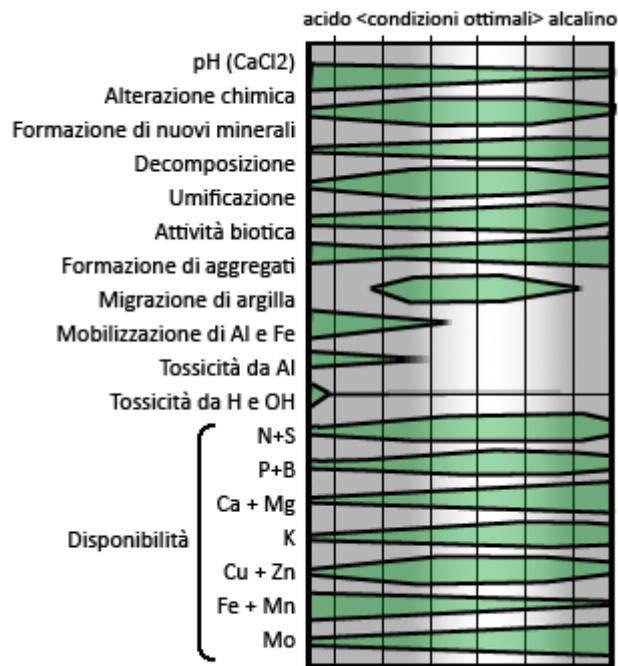



Figura 1.4 - Effetti del pH sui processi pedogenetici, sulle caratteristiche del suolo e sulla disponibilità dei nutrienti. Lo spessore delle bande indica l'intensità dell'effetto o il grado di disponibilità dei nutrienti (Violante, 2000)

1.10.1.2. La capacità di scambio cationica (CSC)

Questo parametro fornisce un'indicazione della fertilità potenziale del suolo e sulla natura dei minerali argillosi.

La CSC è una caratteristica del suolo legata alla presenza quali–quantitativa della frazione colloidale, sia essa organica o minerale.

Sulla componente colloidale avente carica negativa o positiva si legano cariche di segno opposto.

Gli ioni adsorbiti sono in costante equilibrio con quelli che si trovano in soluzione nel suolo e diventano disponibili per le piante.

I fattori che influenzano questo equilibrio dipendono dalle caratteristiche del colloide (detto scambiatore, dotato di proprietà di adsorbimento) e degli ioni (raggio ionico, numero di cariche, etc.).

Gli ioni che generalmente vanno a neutralizzare i siti negativi costituenti la CSC sono calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), potassio (K^+), sodio (Na^+), alluminio (Al^{3+}), idrogeno (H_3O^+).

1.10.1.3. La granulometria

La granulometria (o tessitura) rappresenta il rapporto percentuale tra le diverse frazioni del terreno, *grossolana*, *sabbiosa, limosa* e *argillosa.* La distinzione è fatta unicamente dal punto di vista dimensionale (Belsito, Fraticelli, Salisbury, & Ross, 1991).
L'importanza di questo parametro è sia di natura chimica che fisica, infatti può influenzare sia proprietà come porosità e capillarità, con conseguenze sui rapporto terreno–acqua–aria, che fenomeni legati allo sviluppo dei solidi costituenti (Sequi, 1989).

Tabella 1.2 - Classi granulometriche del terreno secondo International Society of Soil Science (ISSS) e United States Department of Agriculture (USDA)

Classificazione ISSS		**Classificazione USDA**	
Frazione	**Diametro** (mm) **compreso fra**	**Frazione**	**Diametro** (mm) **compreso fra**
		Sabbia molto grossa	2.0 e 1.0
Sabbia grossa	2 e 0.2	Sabbia grossa	1.0 e 0.5
		Sabbia media	0.5 e 0.25
Sabbia fine	0.2 e 0.02	Sabbia fine	0.25 e 0.10
		Sabbia molto fine	0.10 e 0.05
Limo	0.02 e 0.002	Limo	0.05 e 0.002
Argilla	0.002 e 0	Argilla	0.002 e 0

1.10.1.4. La capacità di ritenzione idrica (Water Holding Capacity)

La Water Holding – Capacity (WHC) è la capacità di un suolo di trattenere l'acqua. Questo parametro dipende da alcune caratteristiche del suolo tra cui la tessitura e il contenuto di sostanza organica. Un suolo con una componente argillosa elevata avrà una maggiore capacità di trattenere l'acqua rispetto ad un terreno sabbioso. Come dicevamo anche la sostanza organica può influenzare la WHC: con l'aumentare di questa componente aumenterà la capacità del suolo di trattenere l'acqua.

1.10.1.5. Il carbonio organico e l'azoto totale

Il contenuto di carbonio organico nel suolo è in stretta relazione con quello della sostanza organica, anche se la composizione di quest'ultima presenta un elevato grado di variabilità (Bremner & Jenkinson, 1969). La sostanza organica mediante le sue componenti umiche è in grado di influire sulla capacità di scambio cationico, come precedentemente descritto: per tale motivo la determinazione del carbonio organico costituisce una delle analisi di maggior interesse dal punto di vista agronomico (Violante, 2000).

1.10.1.6. Le forme del carbonio nei suoli

Nei suoli il carbonio può presentarsi in tre forme base:

- elementare;
- inorganico;
- organico.

La qualità della materia organica nel suolo è fondamentale per la ripartizione e la biodisponibilità dei contaminanti nel suolo.

Forma elementare del carbonio

La forma elementare del carbonio include carbone da legna combusta, fuliggine, grafite. Nei terreni, le fonti primarie di carbonio elementare provengono da prodotti di combustione incompleta di materia organica, fonti geologiche o da dispersione durante operazioni di estrazione.

Forma inorganica del carbonio

La forma inorganica del carbonio deriva da fonti geologiche ed è presente nei suoli e sedimenti in genere sottoforma di carbonati. Le due forme di carbonio inorganico più presenti nel terreno e nei sedimenti sono la calcite ($CaCO_3$) e la dolomite ($CaMg(CO_3)_2$); vi è

presenza anche di altre forme a seconda del luogo di formazione. La calcite e la dolomite presenti nei suoli e nei sedimenti possono anche provenire da fonte antropogenica poiché risultano da alcune pratiche agricole (es. calcinazione).

Forma organica del carbonio

Nei suoli e nei sedimenti, vi è una grande varietà di forme di carbonio organico che vanno da materiali appena depositati (es. materiale vegetale di forme diverse) a materiale altamente decomposto come l'*humus.* Un'altra forma di carbonio organico deriva da immissioni da attività antropiche. Il rilascio di contaminanti nell'ambiente aumenta il contenuto totale di carbonio presente nei suoli e nei sedimenti.
Alcuni siti contaminati possono contenere una significativa quantità di particelle di carbone organico, ad esempio proveniente da fibre di legno o ritagli di pelli derivanti da scarti di conceria. In tali situazioni, il contributo del carbonio organico totale potrebbe essere consistente.

1.10.1.7. La sostanza organica

Alla sostanza organica si attribuiscono varie funzioni che in generale contribuiscono all'aumento della fertilità del terreno.
Tra le funzioni chimico-fisiche si segnalano da un lato gli effetti positivi che questa ha sulla struttura del suolo e dall'altro l'attenuazione dei difetti derivanti da una tessitura non equilibrata:

- formazione di complessi argillo-umici: la sostanza organica umificata migliora la struttura del terreno, permettendo la formazione di aggregati strutturali primari di dimensioni ottimali;
- nei terreni sciolti migliora la capacità di ritenzione idrica. Va specificato che l'*humus* ha una capacità d'imbibizione tale da assorbire quantitativi d'acqua fino a 20 volte rispetto al proprio peso;

- nei terreni argillosi migliora la permeabilità ed il rapporto tra micro e macropori e riduce la tenacia;
- riduce la predisposizione all'erosione superficiale;
- aumenta la capacità portante del terreno, riducendo i danni dovuti alla compressione esercitata dalle macchine agricole o dal calpestio dell'uomo.

Tra le funzioni chimico–fisiche si considera in particolare il ruolo svolto nelle dinamiche che regolano la disponibilità e l'assorbimento degli elementi nutritivi, in parte dovuto all'aumentare del tenore dei colloidi:

- aumento degli ioni potassio, calcio, magnesio in virtù dell'elevata capacità di scambio cationico dell'*humus*;
- aumento della capacità di ritenzione del fosforo per adsorbimento anionico;
- aumento della capacità di ritenzione degli elementi nutritivi per assorbimento biologico;
- protezione dei microelementi dall'insolubilizzazione grazie alla chelazione;
- aumento del potere tampone.

Tra le funzioni ecologiche:

- protezione dall'erosione;
- stimolazione dell'attività biologica in generale;
- inattivazione per adsorbimento di molti composti organici ad azione biotossica, sia di origine biologica che sintetica.

I terreni ricchi di sostanza organica sono a tutti gli effetti sistemi di smaltimento che riducono i fenomeni di inquinamento (Schumacher, 2002).

1.10.1.8. La biomassa microbica

La biomassa microbica del suolo è un bacino di vita che rappresenta 1–5 % della materia organica del sistema edafico, escludendo meso e macrofauna. La determinazione della biomassa microbica può indicare cambiamenti della materia organica prima ancora di poter essere rilevati attraverso la misurazione del carbonio totale del suolo, rendendo possibile il suo utilizzo come indicatore precoce dei cambiamenti in atto (De Polli, Costantini, Romaniuk, & Sampaio Pimentel, 2007).

1.10.1.9. Il Quoziente microbico

Nei processi di formazione e degradazione della sostanza organica (S.O.) sono coinvolti fattori biotici ed abiotici. Tra i fattori abiotici ricordiamo gli sbalzi termici del terreno (gelo e disgelo delle soluzioni extracellulari) che determinano la rottura della struttura del suolo, la percolazione dell'acqua piovana con trasporto di composti organici a basso peso molecolare, l'ossidazione spontanea della S.O (Amato, Migliozzi, & Mazzoleni, 2004).
I microrganismi del suolo svolgono un ruolo essenziale nei processi di formazione della sostanza organica. Questi processi aumentano la qualità del suolo e sono in grado di rendere disponibili nutrienti per le piante che altrimenti rimarrebbero immobilizzati nella materia organica.

1.10.1.10. L'attività enzimatica totale

L'attività microbica totale è dimostrata esser una buona misura per determinare il *turnover* della materia organica negli ambienti naturali. Più del 90% del flusso di energia passa attraverso i microrganismi decompositori.

1.10.2. Meccanismi del fitorimedio

I meccanismi che stanno alla base del fitorimedio possono essere classificati in base al tipo di destino che subiscono i contaminanti (EPA, 2000).
Di seguito vengono descritti:

- fitoidraulica,
- fitostabilizzazione,
- rizodegradazione,
- fitoestrazione,
- fitodegradazione,
- fitovolatilizzazione.

Spesso la tecnica del fitorimedio vede la copresenza dei distinti meccanismi.

1.10.2.1. Fitoidraulica

La vegetazione può influenzare in modo significativo l'idrologia locale. La fitoidraulica è la capacità delle piante di evapotraspirare le fonti d'acqua superficiali e sotterranee. La migrazione dell'acqua dalla superficie verso gli strati più profondi può essere limitata dalla capacità delle piante di intercettare le acque attraverso l'apparato radicale (Figura 1.5).
Se le acque riescono ad infiltrarsi negli strati profondi del suolo è possibile che avvengano fenomeni di percolazione di contaminanti, con conseguente contaminazione delle acque sotterranee. Il tasso di riempimento delle falde non dipende solo dalla profondità raggiunta dagli apparati radicali delle piante, ma anche dalle caratteristiche del suolo.
Alberi ampiamente impiegati per questa pratica di fitorimedio sono pioppi e salici (EPA - Division of Water Quality, 2009).

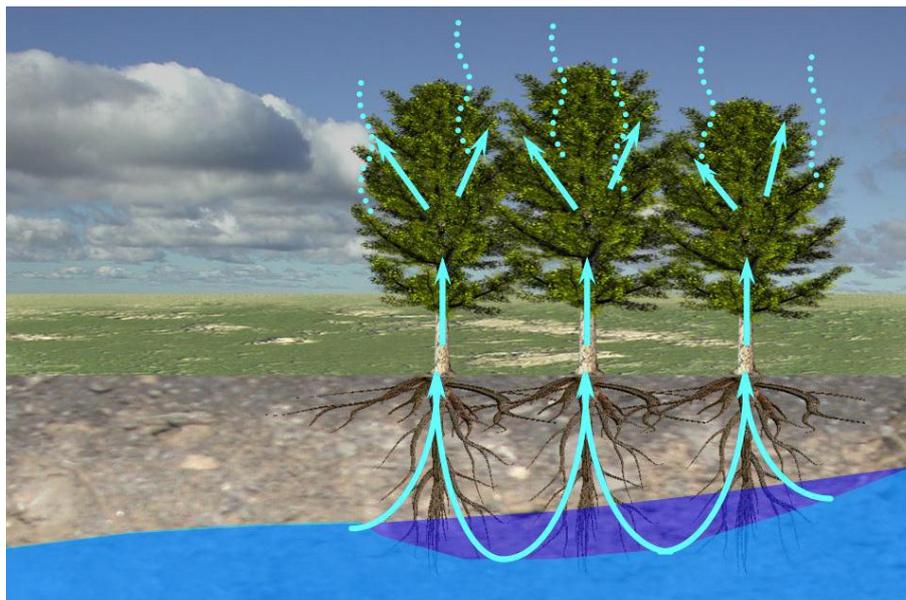



Figura 1.5 - Processi idraulici ad opera delle piante (ITRC, 2009)

1.10.2.2. Fitostabilizzazione

La fitostabilizzazione viene definita come la capacità di ridurre la mobilità dei contaminanti e prevenirne la migrazione nel suolo, acqua ed aria attraverso i seguenti meccanismi:

- *Complessazione fitochimica nella zona radicale*: prodotti fitochimici possono venir essudati nella rizosfera, consentendo l'immobilizzazione o la precipitazione dei contaminanti nella zona radicale. Questo meccanismo può ridurre la frazione disponibile dei contaminanti (Figura 1.6 meccanismo A).
- *Inibizione del trasporto proteico nelle cellule radicali*: le proteine di trasporto associate alle membrane esterne della superficie radicale possono legarsi in modo irreversibile e stabilizzare i contaminanti sulla superficie radicale, impedendo loro di entrare nel sistema vascolare della pianta (Figura 1.6 meccanismo B).

- *Stoccaggio vacuolare nelle cellule radicali*: le proteine di trasporto possono facilitare il trasferimento dei contaminanti tra le cellule. Le cellule vegetali possono agire in parte come un deposito di scorie per la pianta grazie alla presenza di un comparto, il vacuolo, all'interno del quale i contaminati possono venir sequestrati, impedendo il più possibile il trasporto di questi attraverso lo xilema (Figura 1.6 meccanismo C).

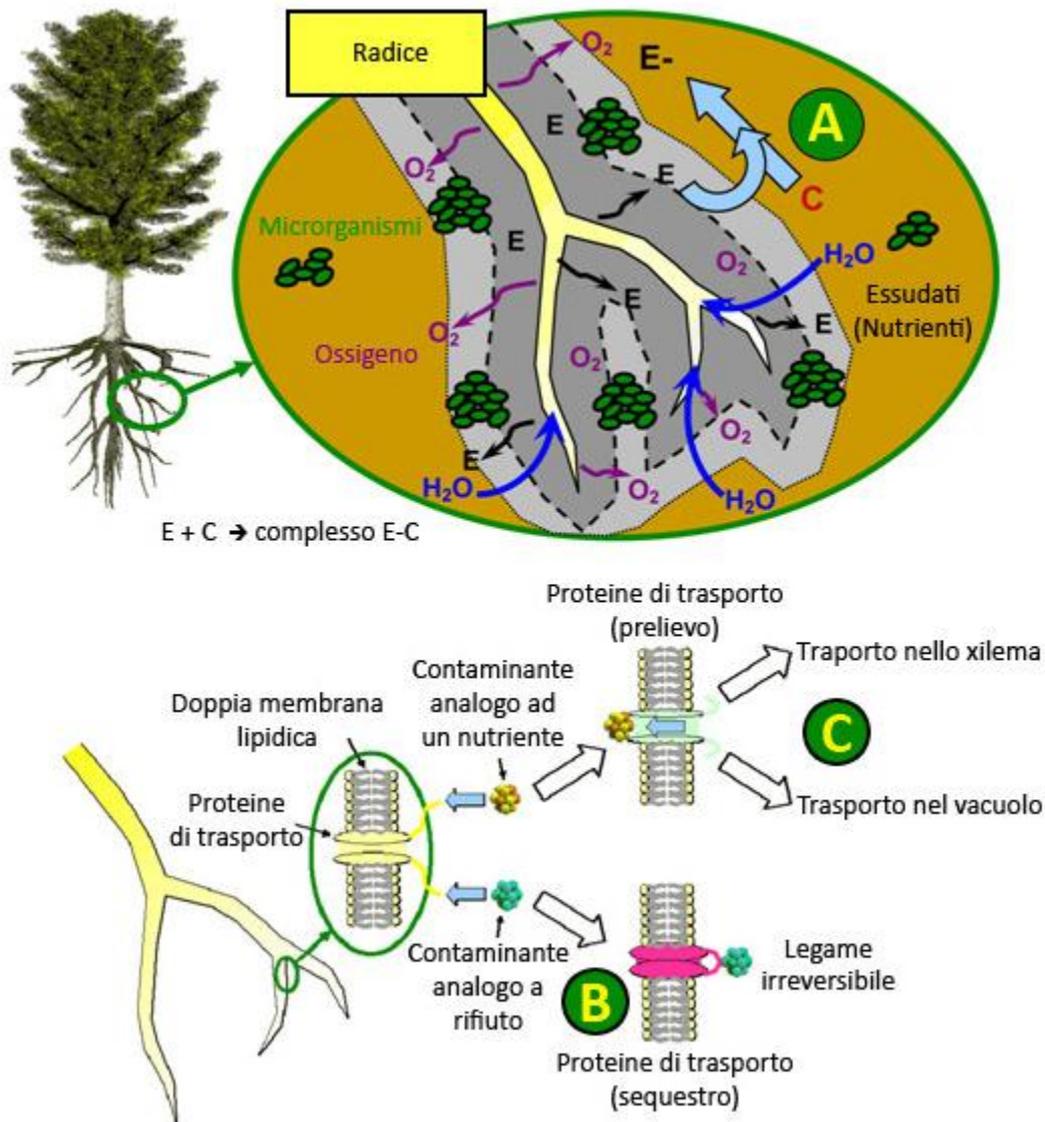



Figura 1.6 - Meccanismi di fitostabilizzazione. A: Complessazione fitochimica (gli essudati E complessano i contaminanti C immobilizzandoli) B: inibizione del trasporto proteico, C: Conferimento vacuolare (tradotto da ITRC, 2009)

1.10.2.3. Rizodegradazione

La presenza di contaminanti nel suolo tende a selezionare naturalmente organismi come lieviti, funghi e batteri che utilizzano queste sostanze come fonte di nutrimento ed energia. Il tasso di degradazione, metabolizzazione o mineralizzazione del contaminante nel suolo dipende dalla bioattività esistente nel terreno (Adriano, Bollag, Frankenberger, & Sims, 1999).

Per aumentare la bioattività, si deve creare una relazione simbiotica tra le piante e le comunità microbiche della rizosfera. Le piante forniscono i nutrienti necessari per far crescere bene i microrganismi, mentre i microrganismi provvedono a migliorare la qualità del suolo dove le piante crescono.

Le piante emettono nel terreno degli essudati specifici (*phytochemicals:* zuccheri, alcoli, carboidrati, etc.) che sono le fonti primarie di cibo per gli organismi i quali aiutano a migliorare la qualità del suolo.

Le piante grazie a questo sistema simbionte sono protette dall’attacco di agenti patogeni, tossine e altre sostanze chimiche che sono naturalmente presenti nel suolo. La comunità microbica presente in un suolo con pianta può essere di diversi ordini di grandezza superiore se confrontata con un suolo in assenza di pianta (ITRC, 2009).

La rizodegradazione migliora la degradazione dei contaminanti aumentando l’attività biologica ed usando l’ambiente rizosferiale per stimolare la popolazione microbica. Ed è proprio l’aumento dell’attività biologica ad aumentare la probabilità che i contaminanti organici possano venir confinati e/o degradati nel suolo; questo fenomeno può portare a riduzioni significative della contaminazione, rappresentando un’azione di bonifica efficace.

Gli agenti inquinanti possono avere caratteristiche analoghe alle sostanze essudate dalla pianta (*phytochemicals*) e quindi venir metabolizzati come sostituti di fonte primaria di carbonio da parte dei microorganismi.

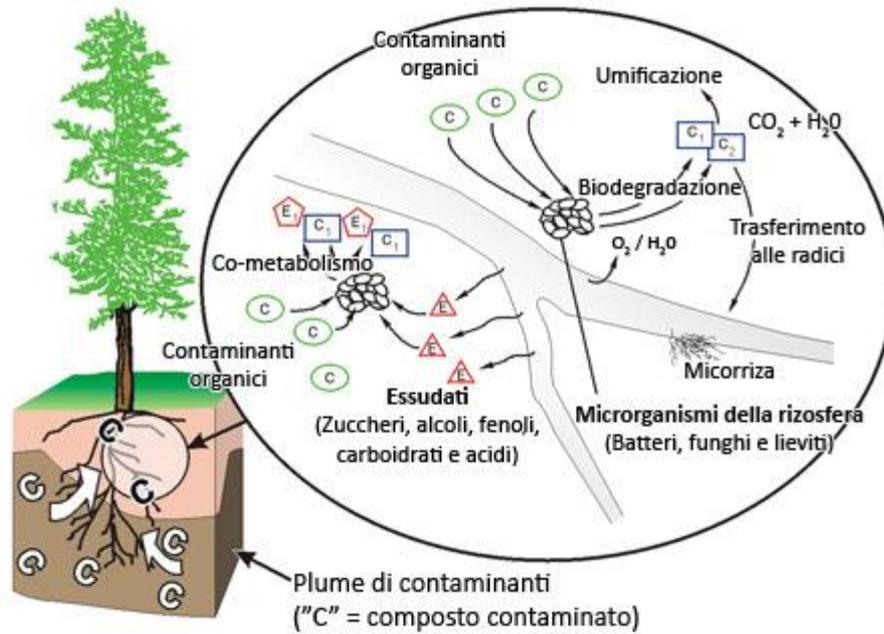



Figura 1.7 - Processi di rizodegradazione (ITRC, 2001)

1.10.2.4. Fitoestrazione

La fitoestazione si riferisce alla capacità delle piante di assimilare sostanze contaminanti attraverso le radici e traslocarle nei tessuti della pianta. Perché il contaminante possa venir estratto dalle piante deve essere disciolto nell'acqua del suolo e portato a contatto con gli apparati radicali. Dopo l'assorbimento, il contaminante può venir disciolto nell'acqua di traspirazione o coinvolto nei meccanismi di trasporto delle piante (Figura 1.8) mostra entrambe le vie di assorbimento.

In seguito al prelievo del contaminante, la pianta può lignificare la sostanza nella biomassa o può sequestrarla nei vacuoli. In alternativa a questo processo, si potrebbe verificare la metabolizzazione del contaminante attraverso processi di fitodegradazione e/o fitovolatilizzazione nel flusso in uscita durante la traspirazione.

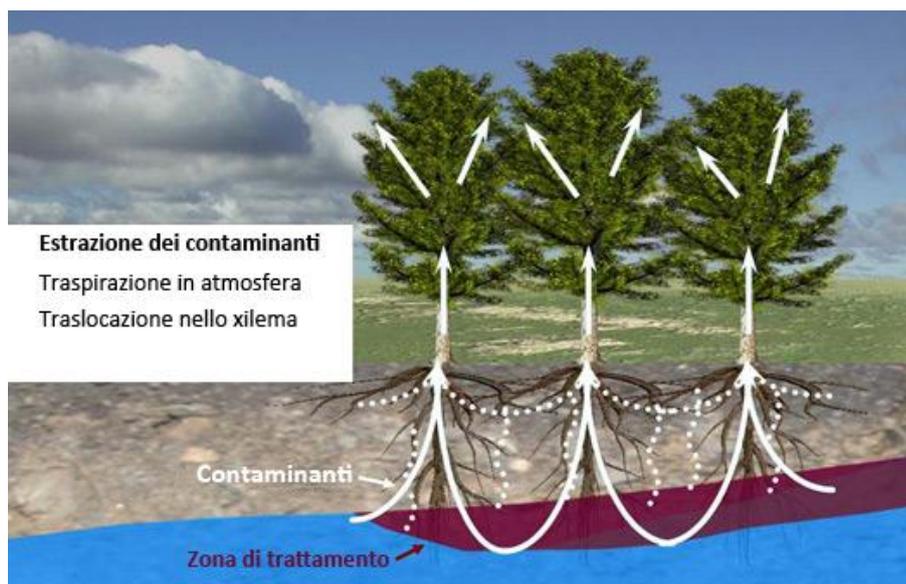



Figura 1.8 - Meccanismi di fitoestrazione (ITRC, 2009)

Per definire il comportamento ambientale di un inquinante organico, particolare importanza riveste il coefficiente di ripartizione acqua–ottanolo (log K_{ow}), citato precedentemente.

Come già detto in precedenza (Cap. 1.5) contaminanti con $1.0 < \log K_{ow} < 3.5$ possono venir fitoestratti dalla pianta, quindi sostanze come benzene, toluene, etilbenzene e xilene (BTEX), solventi clorurati ed idrocarburi alifatici a catena corta, sono soggetti a fitoestrazione.

Per i contaminanti inorganici come sali, metalli e radionuclidi, il prelievo nella pianta e la traslocazione nei tessuti della parte epigea dipende dal potenziale redox, dalle caratteristiche chimico - fisiche del suolo, e dalla specificità della pianta. Generalmente i metalli prontamente biodisponibili per l'assorbimento vegetale comprendono As, Cd, Cu, Ni, Se e Zn; Co e Fe risultano moderatamente biodisponibili a differenza di Cr, Pb e U che lo sono poco. Molte di queste sostanze, spesso considerate come contaminanti ambientali, sono anche elementi essenziali per le piante.

Alcune piante definite iperaccumulatrici (Zerbi & Marchiol, 2004), sono in grado di assimilare quantità elevate di metalli, se confrontate con altre piante. Una pianta iperaccumulatrice, per esser definita tale, deve essere in grado di accumulare almeno 1.000 mg/kg nella sostanza secca di uno specifico metallo o metalloide (per alcuni metalli o metalloidi, la concentrazione può essere di 10.000 mg/kg) (Baker & Brooks, 1989). Allo stesso modo, le

alofite sono piante in grado di tollerare e in alcuni casi accumulare cospicui quantitativi di sali (solitamente NaCl, così come cloruri di Ca e Mg).

1.10.2.5. Fitodegradazione

Il meccanismo di fitodegradazione o anche detto fitotrasformazione, si riferisce al prelievo con successiva degradazione, mineralizzazione e metabolizzazione dei contaminanti all'interno della pianta attraverso diverse reazioni chimiche e metaboliche. Il suddetto meccanismo è rappresentato in Fig. 1.9.

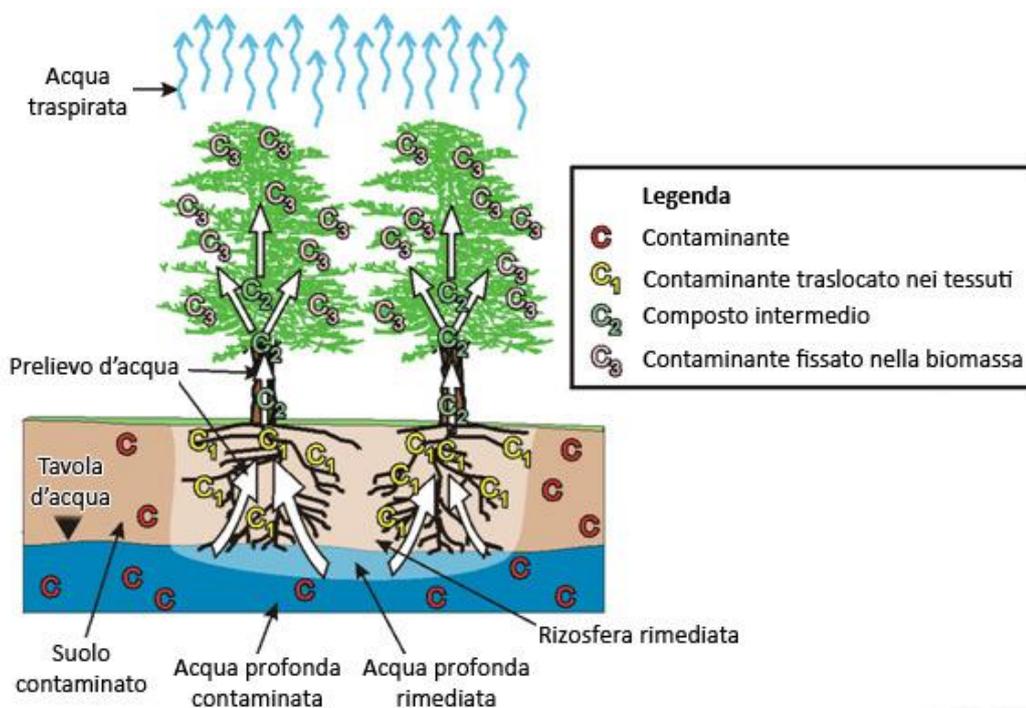



Figura 1.9 - Fitodegradazione di contaminanti organici (ITRC, 2001)

Le piante attraverso la produzione di enzimi aventi diverse attività e funzioni sono in grado di catalizzare numerose reazioni interne. Nello specifico, le ossigenasi sono state identificate in piante che sono in grado di degradare idrocarburi alifatici e composti aromatici (Singh & Jain, 2003). Molti enzimi vegetali possono consentire alla pianta di metabolizzare o mineralizzare completamente i contaminanti producendo anidride carbonica ed acqua (ITRC, 2009). In questo contesto vengono studiate anche piante transgeniche e batteri associati ad esse, in

particolare per trattare contaminanti refrattari alla degradazione (Benoit Van Aken, Paola, & Schnoor, 2010). L'impiego di piante transgeniche nelle bonifiche e batteri ad esse associati richiede serie valutazioni di rischio, eventuali precauzioni e quadri normativi, e considerazioni d'opportunità, preliminari all'applicazione sul campo, in particolare per evitare il rischio di un trasferimento orizzontale indesiderato di geni a piante selvatiche o coltivate (Miller, 1997).

1.10.2.6. Fitovolatilizzazione

La fitovolatilizzazione è un meccanismo che interessa sia contaminanti organici che inorganici. I contaminanti presenti nel suolo devo esser disponibili per la pianta, la rizosfera ha un ruolo chiave nella modifica dei diversi composti prima della captazione. Una volta dentro la pianta, l'agente inquinante è traslocato attraverso lo xilema nelle foglie, dove viene rilasciato in atmosfera attraverso il processo di traspirazione. Un sistema molto studiato è l'uso dei pioppi per la fitovolatilizzazione di tricloroetilene (TCE o prodotti di degradazione di questo). Sono stati condotti studi anche sulle piante di tabacco, modificate geneticamente per esser in grado di prelevare alte concentrazioni di metil–mercurio (ITRC, 2001).

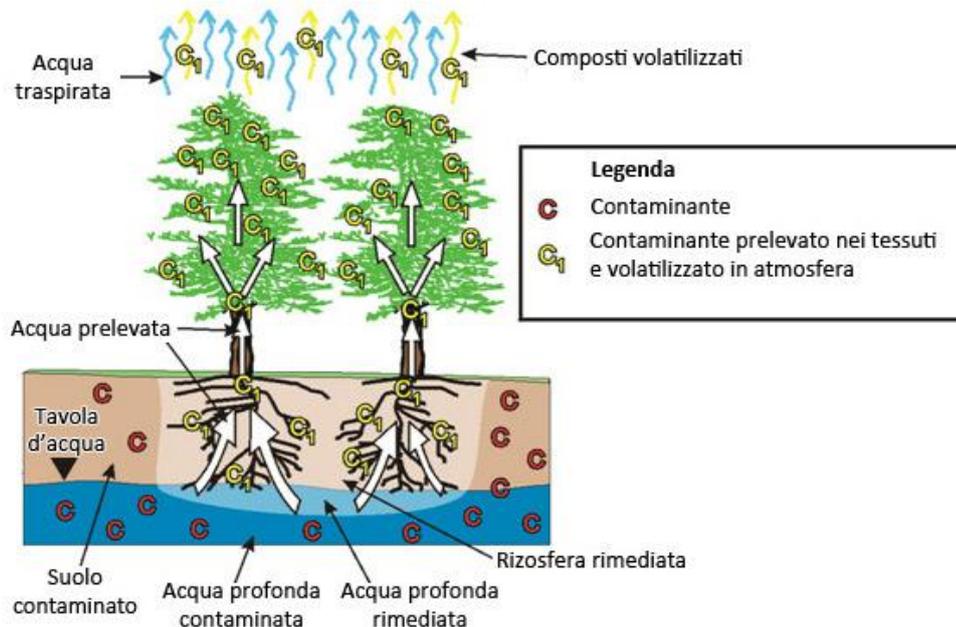



Figura 1.10 - Fitovolatilizzazione di inquinanti organici (ITRC, 2001)

1.10.3. Vantaggi e limiti del fitorimedio

Le fitotecnologie (o *green technologies*) possono essere applicate ad una vasta gamma di condizioni ambientali. Rispetto alle tradizionali tecnologie di bonifica o risanamento ambientale, possono venir applicate per il trattamento di contaminati organici e inorganici, presenti nel suolo, nei sedimenti, nelle acque superficiali e profonde.
A seguire vengono proposti alcuni vantaggi dell'impiego di questi metodi:

- Sono considerati tecnologie verdi e sostenibili;
- Funzionano ad energia solare;
- Migliorano la qualità dell'aria e sequestrano gas responsabili dell'effetto serra in atmosfera;
- Minimizzano le emissioni aeree, acqua di scarico e rifiuti di seconda generazione;
- Sono in grado di controllare processi di erosione, ruscellamento, infiltrazione e sospensione del particolato;
- Sono processi che avvengono *in situ*;
- Vengono considerati positivamente da parte dell'opinione pubblica, spingono anche verso un processo educativo ed una maggiore attenzione verso l'ambiente;
- Migliorano l'aspetto del paesaggio, e riducono il rumore;
- Possono venir impiegate a completamento di altri approcci di bonifica o come fase di rifinitura;
- Possono essere installate come una misura preventiva, ad arginare possibili diffusioni (percolazione, dilavamento etc.) di contaminazione;
- Prevedono bassi costi di manutenzione, hanno la capacità di autogenerarsi (*self-reparing*);
- Creano *habitat* per la fauna locale;
- Prevedono il miglioramento della qualità del suolo durante i processi di bonifica attuati dalle piante;
- Sono competitivi dal punto di vista economico.

Tuttavia come tutte le tecnologia di bonifica, il fitorimedio è adatto solo a determinate condizioni.
I limiti principali sono:

- la profondità d'azione, perché correlata allo sviluppo radicale;
- il tipo di suolo, la zona, l'esposizione;
- il tempo necessario a raggiungere gli obiettivi della bonifica.

I vincoli fisici di profondità dipendono dalla specie di pianta impiegata, dalla sua adattabilità al sito (ad esempio la capacità di penetrazione dell'apparato radicale nel terreno rappresenta un aspetto da considerare), nonché dal sito a disposizione e dalle caratteristiche chimico - fisiche del terreno.
Tali limiti devono venir esaminati in sede di valutazione preliminare di un progetto di bonifica per determinare l'applicabilità del processo.

1.10.4. Aspetti economici

Tra tutti i vantaggi che potrebbero spingere a scegliere la pratica del fitorimedio come mezzo per risanare un ambiente alterato, l'aspetto economico è sicuramente quello che più di tutti incide.
Ad oggi non è disponibile una procedura che consenta il calcolo complessivo delle spese, ma è ampiamente riconosciuto che l'impiego del fitorimedio possa permettere un risparmio notevole rispetto alle tecniche tradizionali.
I costi complessivi di un trattamento comprendono:

- costi di progettazione (caratterizzazione del sito, progetto dell'opera, studi pilota e test di laboratorio);
- costi di pretrattamento (costruzione di infrastrutture e servizi necessari, recinzioni etc.);

- costi di piantumazione e semina;
- costo di esercizio (manutenzione del verde, controllo delle qualità del suolo, monitoraggio della chimica del suolo e dell'evoluzione nel tempo della contaminazione);
- costi di gestione;
- costi di smaltimento dei prodotti di scarto.

Un confronto tra diverse pratiche di bonifica viene mostrato di seguito:

Tabella 1.3 - Confronto costi tra diverse tecniche di bonifica (Cescon & Corami, 2011)

Trattamento	Costo
Fitorimedio	30–130 euro/ m^3
Bioventing	45–75 euro/t
Elettrocinesi	250–750 euro/t
Soil washing	146.5 euro/m^3
Desorbimento termico	600 euro/t

La scelta di adottare il fitorimedio come pratica di bonifica, non è però da ricondurre solo a questioni economiche essa è sicuramente da considerare tra le possibilità, ma possiede dei limiti: non risulta, infatti, adatta a tutti i casi di contaminazione del suolo, ad esempio in considerazione della fitotossicità di alcune concentrazioni di inquinanti.

1.11. Biodisponibilità dei contaminanti

Un ulteriore aspetto trattato in questo studio, in considerazione della resistenza alla rizodegradazione di alcuni IPA in alcuni contesti di contaminazione è la valutazione della biodisponibilià dei contaminanti; si è inteso verificare se forme di contaminazione "invecchiata" possano rilasciare contaminanti idrofobi quali gli IPA "pesanti", misurando il potenziale accumulo in una specie che vive a stretto contatto con la matrice suolo, l'*Eisenia andrei*.

Come abbiamo accennato in precedenza la disponibilità di un contaminante, argomento che verrà ripreso ampiamente in seguito, è strettamente correlata alle caratteristiche della specie chimica, alle proprietà chimico-fisiche del suolo e a fattori come il contenuto di acqua,

temperatura ed elementi vegetazionali. Ruolo determinante quindi per comprendere le dinamiche di accumulo dei contaminanti negli organismi, viene attribuito alla caratterizzazione chimico–fisica del terreno.

La biodisponibilità definisce i processi di trasferimento e di *uptake* che potenzialmente una specie chimica ha verso un recettore ecologico o umano; essa è strettamente correlata al tipo di recettore, al percorso di ingresso, al tempo di esposizione e alla matrice contenente i composti chimici.

Figura 1.11 - Rappresentazione delle frazioni biodisponibili e bioaccessibili di un contaminante nel terreno (Semple, Doick, Jones, Burauel, Craven, & Harms, 2004)

È sempre più riconosciuto che la risposta di un ecosistema o di qualsiasi organismo esposto a rischio non dipende dalla concentrazione totale delle sostanza inquinante nel suolo, ma solo da quella parte che risulta esser biologicamente disponibile.

Così, dinanzi al quesito *Quando possiamo considerare un suolo pulito?* la risposta va ricercata nei processi chimico–fisici che portano al sequestro dei contaminati e nei processi biologici che potrebbero portare al rilascio o all'accumulo nell'ecosistema (EPA, 2004).

Al fine di stabilire limiti sensati sulla contaminazione dei suoli, per definire leggi o per rispondere ad una pianificazione lungimirante del territorio, è necessario comprendere appieno tutti i processi che portano al sequestro o al rilascio dei contaminanti (EPA, 2004).

Un altro concetto altrettanto importante è la bioaccessibilità in quanto non tutte le sostanze biodispobili possono esser accessibili. Infatti la bioaccessibilità secondo The Oxford Dictionary of English viene definita come "la capacità di essere avvicinata, raggiunta, accessibile" . Questo implica che sostanze biodisponibili possano non essere bioaccessibili, come nel caso di sostanze organiche che rimangono intrappolate nella sostanza organica, o di matrici con strutture molte porose, come nel caso del biochar che intrappola contaminanti al suo interno. È chiaro che una sostanza può venir degradata da microrganismi o da piante solo se accessibile e disponibile (Semple, Doick, Jones, Burauel, Craven, & Harms, 2004).

2. Casi sperimentali

2.1. L’area di studio

L’area di studio è localizzata in Friuli Venezia Giulia, nella città di Trieste. E’ inserita all’interno di un vasto ed articolato complesso, sia dal punto di vista territoriale che culturale.

È posta tra le mura di un comprensorio che fino al 1971 costituiva il *magnifico frenocomio civico* triestino (Provincia di Trieste, 2008) un manicomio studiato per ospitare complessivamente 700 persone, le quali riportavano deficit psicologici (o che venivano ritenuti tali per i canoni dell’epoca) di diversa natura.

Figura 2.1 - Planimetria generale del nuovo frenocomio e ospizio per cronici, 1903 di Ludovico Braidotti. Progetto originale, collezione privata.

2.1.1. Inquadramento storico

Gli anni settanta rappresentano un punto di svolta radicale per il mondo della psichiatria, svolta che coinvolge tutte le associazioni sanitarie a livello mondiale. È il dott. Franco Basaglia che pone fine al vecchio sistema manicomiale e con la legge 180 del 1978 destituisce queste strutture, aprendone le porte verso le città.

I lavori di costruzione del parco, le cui dimensioni risultano pari a circa 23 ettari, iniziarono nel 1902, seguendo un progetto dell’architetto Ludovico Braidotti.

Complessivamente sull’area sorsero una chiesa, un teatro, una sala di intrattenimenti e la sezione di lavoro, strutture queste collegate tramite una studiata rete di ampi viali alberati e aiuole fiorite. In definitiva, il complesso, costituito da una trentina di edifici e di padiglioni

manicomiali, si sviluppava su un'ampia superficie simmetrica rispetto a un asse principale che ne costituiva la direttrice.

Il manicomio fu inaugurato il 4 novembre 1908 e rimase in funzione per 72 anni.

La gestione del comprensorio diventa di competenza della Provincia di Trieste dal 1923.

Attualmente questo sito viene comunemente indicato come ex–OPP (*ex Ospedale Psichiatrico Provinciale*).

2.1.2. Il sito contaminato ex–OPP

Il sito contaminato che si trova all'interno dell'area ex-OPP, è una lingua di terra posta in scarpata attualmente interdetta all'accesso (ai sensi del D.Lgs. 152/2006 e s.m.i.). L'estensione del sito è stata calcolata e risulta pari a circa 28.500 m^2.

All'interno dell'area esisteva, ed è tuttora presente, una centrale termica attualmente a gasolio, ma che originariamente era alimentata a carbone. Tale centrale termica serviva per approvvigionare solo gli edifici posti nella parte alta del comprensorio, ossia, le cucine e la lavanderia.

Gli edifici collocati a valle, erano invece dotati ognuno di una centrale termica a carbone.

L'intera struttura psichiatrica era disseminata di grandi e piccole centrali di combustione, ciascuna con le proprie caratteristiche di portata.

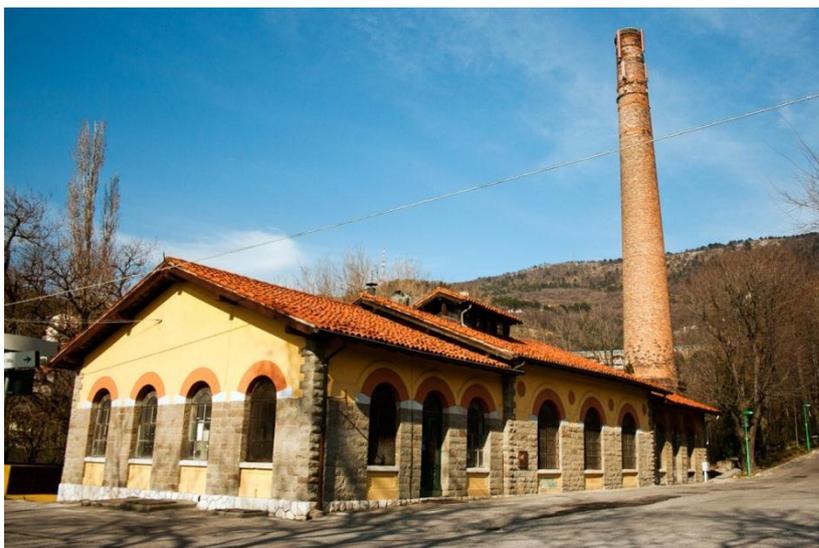



Figura 2.2 – La centrale termica del comprensorio ex-OPP

Per lo smaltimento dei rifiuti, veniva impiegato un inceneritore, la cui documentazione rispetto alla costruzione non è nota (né presso l'Amministrazione Provinciale, né presso l'archivio del Comune di Trieste).
Non c'è traccia di tale struttura neppure nel progetto originale del Braidotti (1902) e non compare nelle foto aeree del 1933 (Luchesi, 2004).
Si ipotizza che lo scarico delle ceneri nel sito contaminato, si sia protratto per un periodo presumibile di circa 70 anni.

Figura 2.3 – L'inceneritore del comprensorio ex-OPP

2.1.3. Cronistoria delle indagini ambientali

Le prime evidenze emersero nel 2004 della presenza di inquinamento nell'area.
Il Consorzio Ravennate delle Cooperative di Produzione e Lavoro, con contratto Rep. n. 65975 dd. 16.04.2004, assunse il progetto esecutivo per i lavori di ristrutturazione dell'ex ospedale per lungodegenti "E. Gregoretti", con il fine di realizzare un centro per anziani non autosufficienti. Seguì una campagna di analisi per la caratterizzazione chimico–fisica e geologica dell'area interessata al fine di individuare gli interventi volti alla sistemazione e al consolidamento della zona.
In seguito a tali indagini emersero delle criticità legate a concentrazioni di elementi chimici e composti superiori ai limiti imposti dalla colonna A della tabella 1 del D.M. 471/99 in relazione ai suoli ad uso verde pubblico, privato e residenziale (cadmio, nichel, piombo, rame, zinco e diossine) (Luchesi, 2004).
I dati riportati nel lavoro dell'Ing. Luchesi hanno spinto il Comune di Trieste a procedere alla notifica ai soggetti previsti, conformemente a quanto disposto dall'art. 7 del D.M. 471/99 (*Notifica di pericolo di inquinamento e interventi di messa in sicurezza d'emergenza*).
A seguito di questa notifica l'area è stata messa in sicurezza recintandone i confini.
Al fine di approfondire le problematicità che interessano il sito, emerse dal *Piano di caratterizzazione dell'area adiacente il cantiere per la realizzazione dei lavori di*

ristrutturazione dell'ex Pad. B del dismesso ospedale per lungodegenti "E. Gregoretti" (Luchesi, 2004), sono state realizzate le seguenti indagini:

- Indagini Ambientali Preliminari ai sensi del D.M. 471/99 nell'area del comprensorio "ex-OPP" di S. Giovanni (Trieste) (Geosyntech, 2005);
- Indagine Ambientale Preliminare di completamento nell'area di proprietà provinciale situata nel comprensorio "ex–OPP" di S. Giovanni (CIGRA, 2006);
- Piano di Caratterizzazione Ambientale per adeguamento al D.Lgs. 152/06 per l'area di proprietà della Provincia di Trieste situata nel comprensorio "ex-OPP di S. Giovanni, Trieste (CIGRA, 2009).

2.1.4. Idrogeologia del sito

I materiali di riporto in scarpata poggiano su masse rocciose di Flysch, molto fessurate e porose, in grado di formare gallerie e fessure nella roccia. L'evidenza è quella di un substrato poroso, con buone caratteristiche percolanti, evidenziate dalla capacità di far defluire le acque apportate da grandi piogge.
La permeabilità, che può essere per fessurazione o per porosità, varia in funzione della componente arenacea, nella quale le acque sono in grado di penetrare e dar luogo a una circolazione sotterranea.
A valle del sito contaminato, un torrente anonimo, che si presenta per lo più tombato, costeggia il muro perimetrale.
Durante il Piano di Caratterizzazione, eseguito nel 2006, sono stati prelevati due campioni di acqua; le analisi hanno rilevato concentrazioni molto inferiori ai limiti di emissione per le acque reflue urbane e industriali (tab. 4, Allegato 5, Parte III, D.Lgs. 152/06).
Inoltre durante le fasi di caratterizzazione del sito non è mai stata rilevata la presenza di acqua di falda o presenza di acque di scorrimento superficiali (CIGRA, 2006) (Kranitz, 2004).

2.1.5. Caratteristiche geostatiche

Il sito in scarpata riporta una pendenza media pari a 35°. (Kranitz, 2004), nel suo studio, fa delle considerazioni geotecniche sull'area mostrando che non vi sono segni di dissesto in atto. È stato condotto dallo stesso Kranitz, uno studio di stabilità verificando l'esistenza di potenziali superfici di scivolamento complesse, eseguito col Metodo dei Conci, utilizzando la nota trattazione analitica di Jambu.
Le verifiche di stabilità eseguite hanno individuato una superficie critica di scivolamento con fattore di sicurezza pari a 1.05, inferiori ai valori minimi di legge quindi è stata confermata la stabilità del versante.

2.1.6. Caratteristiche meteo climatiche

I dati meteorologici sono stati forniti dalla stazione dell'Osservatorio Meteorologico Regionale (OSMER–FVG) di Trieste.
L'arco temporale considerato va dal 1994 al 2010.

Temperatura

I mesi nei quali vengono registrati i valori minimi assoluti della temperatura dell'aria (tra il 1994 e il 2010) sono dicembre e gennaio. Il valore più basso misurato, valore pari a -6.8 °C, è stato rilevato nel dicembre 1996.
I valori massimi invece si osservano nei mesi di luglio e agosto. Il valore più alto riportato è pari a 38.1°C e il mese in cui lo stesso è stato registrato è agosto del 1998.

Vento

I fenomeni ventosi di maggiore intensità si manifestano nei mesi di novembre e dicembre. La bora può raggiungere picchi di intensità pari a i 180 Km/h.

Precipitazioni

I mesi meno piovosi negli ultimi 10 anni risultano essere febbraio, marzo e aprile, contrariamente, quelli che riportano una precipitazione più abbondante sono agosto, settembre e novembre. Per l'anno 2010 i dati medi di precipitazione su scala annua sono stati di 1.328 mm.

2.1.7. Osservazioni specie arboree

Durante la fase di ricognizione di aree idonee alla realizzazione di un impianto sperimentale di fitorimedio, sono state censite le specie arboree ed arbustive presenti all'interno dell'area interdetta. Questo studio è risultato necessario per individuare spazi sufficientemente aperti ed esposti al sole, che rendesse possibile la crescita normale delle essenze erbacee considerate nella sperimentazione del fitorimedio, effettuando uno *screening* iniziale e generalizzato rispetto alla vegetazione presente.
Le specie predominanti durante l'osservazione sono state:
Laurus nobilis, Euonymus japonicus, Fraxinus excelsior, Robinia pseudoacacia, Fraxinus ornus, Crategus monogyna, Ostrya carpinifolia, Sambucus nigra, Ulmus campestris, Celtis australis, Quercus petrea, Morus nigra, Ailanthus altissima.
È stata realizzata una rappresentazione cartografica utilizzando il programma AutoCAD (2007) nella quale vengono riportate le posizioni delle alberature.

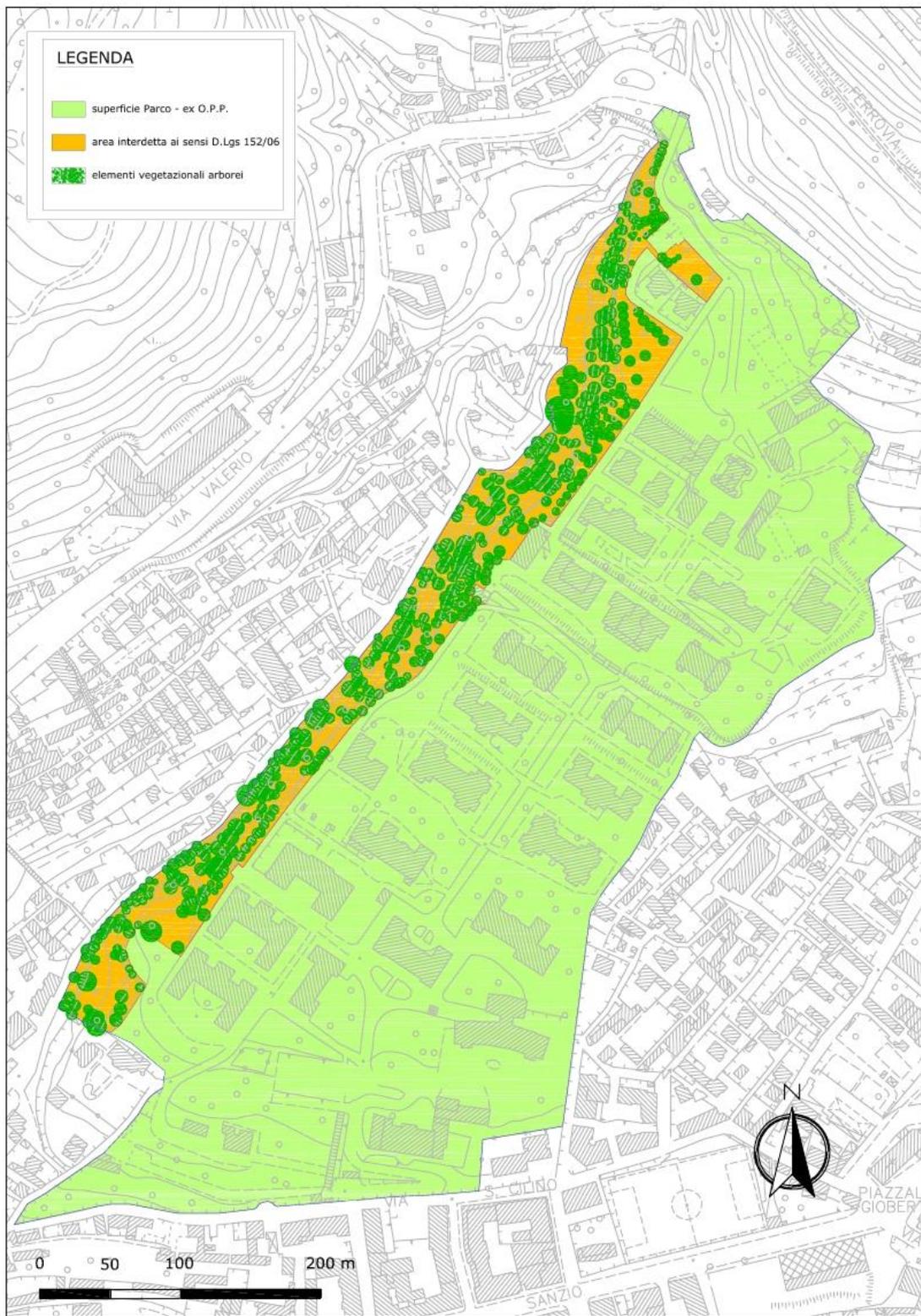



Figura 2.4 - Mappatura specie arboree

2.2. Rizodegradazione di IPA *in situ* impiegando *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L.

Il sito ex-OPP ha subito una contaminazione complessa: è stata rilevata la presenza di diverse specie di contaminanti oltre agli IPA, quali metalli pesanti e PCB (policlorobifenili). Inoltre la contaminazione aveva caratteristiche recalcitranti, essendo molto datata. Le caratterizzazioni effettuate hanno evidenziato un'eterogeneità ed una gradazione della contaminazione, descritta nel capitolo 2.2.2., con aree maggiormente contaminate in prossimità degli impianti di combustione, e nella parte "a valle" del sito, e aree meno contaminate o nell'area "a monte", più prossima alla strada per Opicina.

Nella prima fase di questo studio si sono raccolte evidenze sperimentali sulla fattibilità di un impianto di fitorimedio *in situ* sul quale osservare gli effetti degradativi di due specie vegetali, *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L., rispetto a una categoria di contaminanti organici, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), in un'area con contaminazione moderata. Come descritto nella parte introduttiva di questo lavoro, gli IPA possono venir degradati dai microrganismi presenti nel suolo (Johnsen, Wick, & Harms, 2005) ed il processo potrebbe venir migliorato dalla presenza delle piante (Rentz, Alvarez, & Schnoor, 2005). Studi molto recenti (Soleimani, Afyuni, Hajabbasi, Nourbakhsh, Sabzalian, & Christensen, 2010) (Teng, et al., 2011) evidenziano l'efficacia della micorrizazione delle piante, che al momento non è stata ancora considerata.

Gran parte della bibliografia scientifica sul tema del fitorimedio, riporta risultati ottenuti in condizioni limitate spazialmente, all'interno di serre o laboratori. Questo primo *step* sperimentale, ha voluto valutare l'efficacia della pratica, spostando l'attenzione su una scala diversa, quella a pieno campo.

2.2.1. Criteri di scelta

Durante la fase di progettazione della sperimentazione sono stati presi in considerazione alcuni aspetti fondamentali:

1. le caratteristiche dell'area di studio;
2. la specie vegetale e l'adattamento all'ambiente;
3. i contaminanti presenti nel comparto suolo;
4. l'accessibilità a fonti idriche.

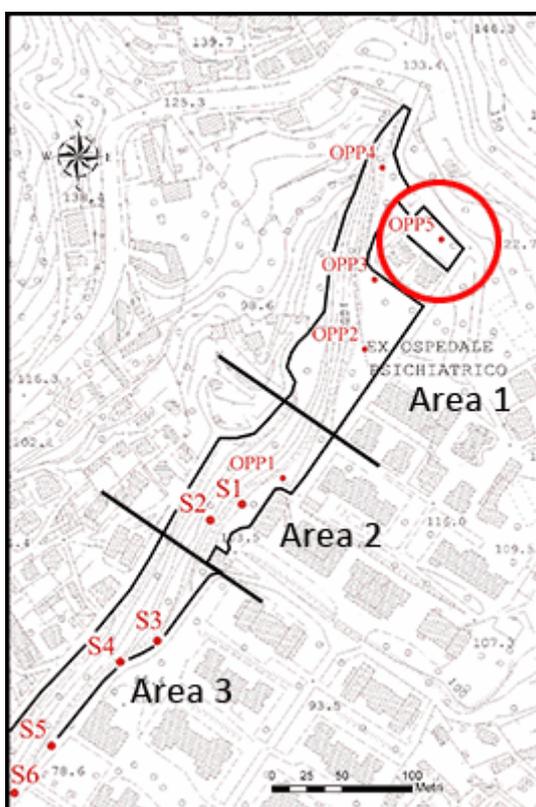



Figura 2.5 - Sito contaminato suddiviso per tipologia di contaminazione. In rosso è evidenziata l'area che ha ospitato la sperimentazione *in situ*.

La progettazione sperimentale ha richiesto un'accurata discussione sul tema, questo è risultato necessario in quanto trattasi di ambiti di competenza trasversali; per ottemperare a quanto appena richiamato, è stato costituito un gruppo di lavoro composto di soggetti provenienti da campi professionali differenti, ossia, chimico, agronomico, naturalistico e giardinieristico.

2.2.2. Scelta del sito sperimentale

L'identificazione di un'area idonea alla sperimentazione *in situ* ci ha spinto ad analizzare i dati analiti che caratterizzavano l'area (Geosyntech, 2005) (CIGRA, 2006).

I campionamenti effettuati nelle due campagne ambientali sono stati riportati su di una carta; questo lavoro preliminare ha permesso

l'identificazione, all'interno dell'area d'interesse, di tre porzioni, peculiari in base al tipo di contaminazione.

Area 1, collocata nella zona nord del sito, presentava livelli di contaminazione contenuti rispetto al resto dell'area. La contaminazione, con riferimento alla Tab. 1 Colonna A, Allegato 1 del D.M. 471/99, riguarda prevalentemente sostanze organiche, quali IPA e PCB.

Area 2, collocata a valle dell'inceneritore e della centrale elettrica principale. È l'area che più di tutte è interessata dal fenomeni di sversamento. I contaminanti maggiormente presenti sono metalli pesanti (Ni, Sn, Zn, Co, V) ed organici (IPA, IC>12, pesticidi).

Area 3, posizionata a sud del sito; in questa zona sono stati riscontrati superamenti sia per composti organici sia per metalli.

L'attenzione per questo studio è stata rivolta, come già precedentemente detto, verso una classe di contaminanti organici, gli idrocarburi policiclici aromatici. L'area che meglio si adattava al presente studio, sulla base di considerazioni riferite a univocità della contaminazione (solo IPA), esposizione al sole (gran parte del sito è posto in ombra e risulta ricoperto da una fitta vegetazione spontanea) e logistiche (accessibilità, disponibilità di condutture d'acqua), è posta nella parte a nord, è rientrante nell'*area 1* e come evidenziato nella Figura 2.5 porta la sigla OPP5.

2.2.3. Le specie selezionate

La base di partenza per la scelta delle specie da applicare nella sperimentazione, nella fattispecie *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L., è stata una ricerca bibliografica sui casi di studio precedenti e sulle caratteristiche delle piante considerate.

Per l'identificazione delle piante idonee è stato utilizzato il processo suggerito da *Plant Selection Process* (EPA, 2000).

A) Considerazioni generali:

- resistenza ad agenti patogeni;
- tolleranza ad organismi fitofagi e parassiti;
- resistenza alla siccità;

- tolleranza a composti chimici;
- tolleranza agli stress;
- tasso di crescita;
- effetti allelopatici e competitività della specie;
- costo e reperibilità delle pianta;
- requisiti e pratica di coltivazione: pretrattamenti del suolo, tipo di semina, manutenzione, irrigazione, concimazione, requisiti per la raccolta.

B) <u>Considerazioni riguardanti la pratica del fitorimedio</u>:
- struttura dell'apparato radicale;
- profondità radicale;
- profondità dell'inquinante;
- scelta del tipo di impianto.

Vengono fornite in seguito le descrizioni delle piante selezionate per il processo di rizodegradazione, riportanti le nozioni fondamentali per le gestioni *in situ*.

2.2.3.1. *Medicago sativa* L.

L'erba *Medicago sativa* L. (o anche detta *alfalfa*) è, tra le specie foraggere, la più coltivata nelle zone a clima temperato; nel mondo la superficie coltivata a medica supera i 30 milioni di ettari.
Gli aspetti positivi di questa pianta sono diversi, e tutti volti a consentire la diffusione su ampie superfici del territorio mondiale, fra cui:
- aumento del contenuto di sostanza organica nel suolo;
- arricchimento dell'azoto fissato nel suolo ad opera dei batteri simbionti;
- aumento dell'attività microbica del terreno;
- miglioramento delle caratteristiche chimico–fisiche del suolo ad opera dell'apparato radicale (Bonciarelli & Bonciarelli, 1989).

Caratteri morfologici

L'erba medica è una pianta perenne con un apparato radicale di tipo fittonante, molto robusto e profondo. In condizioni di terreno sciolto e caratterizzato da buona umidità, raggiunge i 3–4 m di profondità.

Le foglie sono alterne, trifogliate con margine seghettato e apice acuminato. La prima foglia, dopo i cotiledoni è di forma cordata.

Il fusto è cavo e ramificato, raggiunge un'altezza di 80–100 cm. E' presente una corona basale dove si accumula parte delle sostanze di riserva e dalla quale si originano gemme che daranno nuovi steli. Il portamento della pianta è eretto o semieretto.

Figura 2.6 - Rappresentazione dei diverse elementi funzionali di Medicago sativa L. apparato epigeo, infiorescenza, apparato ipogeo, disposizione di legumi sul fusto, dettaglio di legume, semi (fonte Centro Ricerche Produzioni Animali)

I fiori sono zigomorfi, riuniti in racemi di colore viola, a volte colorati con tinte di bianco. L'impollinazione è incrociata, ad opera di insetti pronubi.

I frutti, legumi spiralati, contengono 2-7 semi reniformi di colore giallo - bruno.

Esigenze colturali

Le temperature ideali richieste da *Medicago sativa L.* si stimano entro un *range* di 20°-25°C: in quest'intervallo le rese di fotosintesi e azoto fissazione sono massime. La temperatura minima e massima richiesta per la germinazione è di 5°-35° C; sotto questo valore *Medicago sativa* L. arresta la sua crescita.

Ha notevoli capacità di adattamento anche se predilige i terreni profondi, di medio impasto o argillosi.

Il pH ottimale è tra 6.5 e 8, non tollera i terreni acidi. Infatti con valori di pH sotto i livelli ottimali la simbiosi rizobica si instaura con difficoltà.

È una pianta che soffre per condizioni di ristagno idrico, si adatta con scarso successo a terreni sciolti (Bonciarelli & Bonciarelli, 1989).

Preparazione del terreno

È una pianta che dovrebbe venir piantata all'inizio della primavera o fine estate, opportuna sarebbe una concimazione con fosforo nel pre–impianto. È bene eseguire la semina non appena è terminato il periodo delle gelate (USDA, 2007).

Come visto in precedenza, *Medicago sativa* L. è una pianta che teme i ristagni idrici, da qui la necessità di eseguire della lavorazioni che consentano il drenaggio. Un'aratura profonda (40-45 cm) in tarda estate o autunno, consente al gelo invernale di agire sulla struttura del terreno, rendendolo più sciolto.

Segue un'erpicatura, che consente di frantumare gli aggregati e di livellare il terreno.

Tutte queste lavorazioni devono esser accurate per garantire al seme un giusto contatto con il terreno.

La quantità di seme per impianto varia dai 30-40 ai 20-25 kg/ha. Con questi quantitativi di sementi e con terreni dalle condizioni appropriate si possono ottenere 300-400 piante/m^2.

La profondità di semina deve rispettare l'intervallo 1-1.5 cm.

Dopo aver praticato la semina è bene eseguire una rullatura per favorire il contatto del seme con il terreno (Bonciarelli & Bonciarelli, 1989).

Concimazione

La prima operazione necessaria per valutare l'idoneità di un suolo per la messa a dimora della pianta, è l'analisi del terreno per verificare i livelli di fosforo disponibile. Le concentrazioni definite sufficienti sono di 15-20 ppm (pari a 35-40 ppm di P_2O_5) (Bonciarelli & Bonciarelli, 1989).

Irrigazione

Medicago sativa L. è una pianta con elevate necessità idriche, ma grazie alla resistenza che dimostra alla siccità e al profondo apparato radicale, è in grado di far fronte a questo limite. In caso di periodi di siccità prolungati è in grado di rallentare o sospendere l'attività vegetativa.

Generalmente viene irrigata durante il primo anno di semina o in presenza di periodi particolarmente siccitosi.

Piante infestanti

I principali generi che causano problemi ai medicai, in particolate durante il primo anno di impianto, sono: *Convolvulus, Ranunculus, Portulaca, Stellaria, Rumex, Amaranthus e Capsella bursa–pastoris*. Tra tutti i generi citati quello che da maggiori problemi di controllo è *Cuscuta* (Ashing & Marquez, 2010).

Ai fini del controllo di queste piante è possibile intervenire con appropriate lavorazioni e concimazioni. Queste due pratiche riescono a diminuire molto il rischio del propagarsi di infestanti.

Malattie

Le malattie che solitamente colpiscono *Medicago sativa* L. sono:

- l'avvizzimento della pianta, causato da un battere patogeno, *Erwinia tracheiphila,* che causa problemi al sistema vascolare della pianta, bloccando il sistema di trasporto dei soluti nel sistema xilematico.
- *Fusarium*, genere di fungo appartenente alla divisione ascomiceti. Sono organismi fitopatogeni, che danno luogo a marciumi radicali o alterazioni a carico dell'apparato vascolare, con conseguente appassimento dei germogli. A livello radicale si nota una lignificazione della parte centrale del fittone di colore bruno–giallastro (Minerdi, Moretti, Gilardi, Barberio, Gullino, & Garibaldi, 2007).
- *Phytophthora* è un fungo appartenente alla classe degli oomiceti. I sintomi iniziali sono quelli dell'ingiallimento e avvizzimento delle foglie basali, segue una clorosi diffusa anche nelle foglie più alte della pianta. L'apparato radicale nel suo complesso viene ridotto, provocando in alcuni casi marcescenza (Smiley, Fraedrich, & Martin, 1999).
- *Antracnosi* è un fungo che produce numerose spore in primavera, si diffonde attraverso l'acqua, quindi le condizioni di maggior umidità e piogge ne garantiscono la maggior diffusione. La malattia genera lo seccarsi di parti di tessuti della pianta, in

particolare per *Medicago sativa* L. si manifesta a livello di apparato fogliare (University of California, 2009).

L'altra pianta considerata, anche in considerazione dell'importanza dell'apparato radicale e per questo impiegata nell'ingegneria naturalistica per la capacità di consolidare terreni, è *Vetiveria zizanioides* L.

2.2.3.2. *Vetiveria zizanioides* L.

Vetiveria zizanioides L. o anche conosciuta come *Chrysopogon zizanioides* L. è una pianta perenne appartenente alla famiglia delle Poaceae, ampiamente diffusa nel sud, sud–est asiatico, dove viene coltivata da secoli per il suo olio aromatico, per la costruzione di tetti e per il foraggio da bestiame.

Attualmente il vetiver viene impiegato in tutto il mondo come una "tecnologia" a basso costo, per dar risposta a problemi come la conservazione del suolo.

Negli ultimi anni la ricerca si è spinta a studiarne le proprietà di risanamento del terreno da contaminazione, sia organica che inorganica (Li, Luo, Song, Wu, & Christic, 2006).

Figura 2.7 - Apparato epigeo di *Vetiveria zizanioides* L.

Caratteri morfologici

Il suo apparato epigeo assume dimensioni che vanno dai 0.5 m ai 1.5 m di altezza.

È considerata sterile fuori dal suo ambiente naturale, quindi non invasiva (Mickovski, van Beek, & Salin, 2005).

Figura 2.8 - Apparato ipogeo di *Vetiveria zizanioides* L.

Non ha rizomi o stoloni e si propaga tramite divisione radicale per via agamica. Ha un apparato radicale forte e finemente strutturato: se il terreno è idoneo allo sviluppo, dopo un anno dalla messa a dimora può raggiungere anche i 3-4 m. Le notevoli profondità raggiunte rendono il vetiver una pianta estremamente resistente alla siccità.
Le nuove generazioni vengono originate dalla corona, porzione legnosa sotterranea che rende la pianta resistente alle gelate, al calpestio o ad eventuali incendi (Truong, Van, & Pinners, 2008).

Esigenze colturali

È una pianta che richiede minime cure di mantenimento, inoltre foglie e radici hanno dimostrato una forte resistenza alle malattie. Si adatta ad ambienti molto siccitosi così come a situazioni di ristagno per lungo tempo (The World Bank, 1993).
Il vetiver presenta un'alta tolleranza alle variazioni di temperatura, resiste ad intervalli che vanno da – 15°C a 55 °C. In presenza di gelate la parte aerea interrompe la crescita ed entra in dormienza, mutando il suo colore da verde a viola. Risponde velocemente anche a stress da gelo, siccità o livelli elevati di salinità. È in grado di tollerare un range di pH da 3.3 a 12.5 senza necessitare di correttivi.
Presenta un'elevata tolleranza a substrati di crescita acidi, alcalini, sodici o ricchi di magnesio (Truong, Van, & Pinners, 2008).

Preparazione del terreno

Come si comprende la vetiveria non ha particolari esigenze colturali, ma vi sono alcuni accorgimenti che possono migliorare lo stato della pianta.
Se si decide di disporre le piante in filari, è opportuno scavare solchi profondi e larghi 15-20 cm e per assicurare l'attecchimento, è bene posizionare piante che abbiano sviluppato bene

le radici al centro del solco e coprirle con 20-30 cm di terreno, compattandolo di modo da dare robustezza alla pianta.
E' consigliabile concimare con azoto e fosforo (Truong, Van, & Pinners, 2008).

Malattie

In bibliografia non sono state riscontrate problematiche che affliggono questa pianta. In alcune zone viene suggerita la recinzione per evitare che animali erbivori se ne possano nutrire.

2.2.4. Piano sperimentale

Il sito identificato per la sperimentazione è posto in un appezzamento di terreno in piano, con facilità d'accesso. Prima dell'avvio della sperimentazione si presentava inerbito a prato. Sono stati realizzati alcuni lavori di sistemazione nell'anno 2006. A poca distanza (12 m) dal sito di interesse, posti a valle, ci sono due nuclei abitativi che ospitano pazienti psichiatrici.
Il progetto prevedeva la realizzazione di due parcelle sperimentali confinate, con una superficie complessiva di 3 x 4 m.

2.2.5. Fase progettuale

Prima dell'avvio dei lavori sono stati considerati tutti i criteri che potevano influire sulla realizzazione dell'impianto.

1. *Piano di sicurezza*. Viste le caratteristiche problematiche del sito, è stato predisposto un piano che potesse garantire a tutti gli operatori di agire in assoluta sicurezza con l'adozione di opportuni dispositivi di protezione individuale (DPI).
2. *Superficie dei mesocosmi*. È stato scelto di realizzare vasche di 3 x 4 m poiché potevano rappresentare al meglio una situazione di riproducibilità con l'ambiente circostante.
3. *Posizionamento dei mesocosmi*. Sono stati selezionati i punti nell'appezzamento che presentavano le caratteristiche più idonee per ospitare le vasche contenenti le piante

(esposizione solare, distanza da specie arboree, superfici pianeggianti, scolo dell'acqua etc.).

4. *Impianto di irrigazione.* Al fine di garantire alle piante una crescita adeguata e assicurare al sistema pianta–suolo il giusto equilibro, è stato disposto un impianto di irrigazione costituito da due irrigatori a scomparsa a turbina. Tale impianto si collegava ad un sistema di condutture presenti negli alloggi abitativi poco distanti. Il sistema ha garantito il fabbisogno idrico anche in assenza di un operatore.

2.2.6. Lavorazioni agricole

La preparazione del terreno ha richiesto alcune operazioni agricole. Come precedentemente detto, l'area si presentava inerbita a prato, quindi sono stati realizzati i seguenti interventi preliminari:

- Eliminazione della cotica erbosa;
- Spietramento, allo scopo di ridurre l'eccesso di scheletro;
- Fresatura, per sminuzzare il terreno e prepararlo alla semina;
- Diserbo manuale, per eliminare la presenza di stoloni infestanti;
- Rullatura pre–semina;
- Semina;
- Rullatura post–semina.

Per la realizzazione delle vasche e per ogni operazione di sistemazione del terreno, è stato richiesto l'intervento degli operatori della cooperativa "Agricola Monte San Pantaleone" (TS).

La semina non ha riguardato la totalità della superficie delle vasche. Ai fini di monitorare le condizioni del suolo in assenza di vegetazione, una parte dell'area, avente superficie di 0.7 x 3 m, è stata mantenuta inerbita.

Sia la semina di *Medicago sativa* L. che la messa a dimora di *Vetiveria zizanioides* è avvenuta a settembre del 2007.

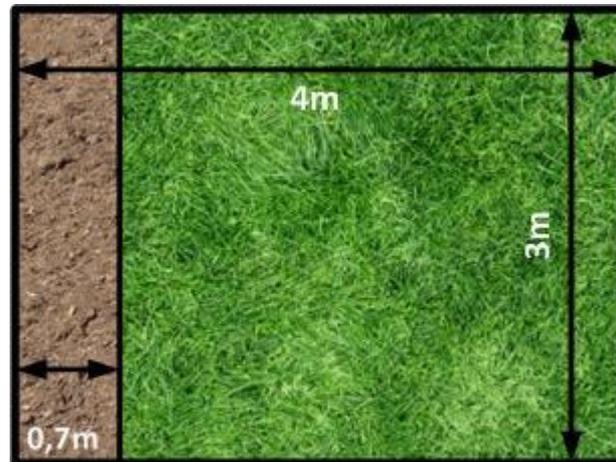



Figura 2.9 - Rappresentazione dei contesti sperimentali

La porzione destinata alla semina è stata costantemente irrigata al fine di far germinare (o attecchire, nel caso del vetiver) le piante.
Un piano di diserbo rigido è stato effettuato con l'obiettivo preventivo di riduzione del danno; i generi di piante infestanti particolarmente presenti nel terreno circostante erano *Ranunculus, Portulaca, Stellaria.*

2.2.7. Piano di campionamento

Al fine di verificare i processi degradativi in relazione al tempo si è predisposto un calendario di campionamenti per entrambe le specie; questi sono stati eseguiti sia sulla parte coltivata sia su quella in assenza di vegetazione.
Segue una tabella riassuntiva delle condizioni sperimentali e dei tempi di campionamento.

Tabella 2.1 - Sigle, date e condizioni del suolo campionato (NS = suolo incolto, S = suolo coltivato)

Sigla	Data	Condizioni sperimentali suolo campionato
T0	04/2007	NS
T1	06/2007	S/NS
T2	09/2008	S/NS

I campionamenti sono stati realizzati effettuando dei prelievi casuali sul sito, prelevando 10 aliquote di terreno sia sulla parte coltivata che su quella incolta. La profondità di prelievo è stata di 0.40 m, cercando di mantenere la massima accuratezza possibile. I campioni compositi, per ogni situazione sperimentale, sono stati omogeneizzati opportunamente mediante miscelazione, sono stati trattati in modo che subissero meno alterazioni possibili. Considerando che gli IPA sono sostanze soggette a degradazione, questa operazione è stata realizzata nel minor tempo possibile. I campioni raccolti sono stati posti in buste di plastica opportunamente siglate (Caudill, Turner, & Patterson, 2007).

2.2.8. Piano delle analisi

Al fine di monitorare e caratterizzare il suolo sperimentale sono state eseguite le seguenti analisi:

Caratterizzazione chimico–fisica:

- Determinazione granulometrica;
- Determinazione del pH;
- Analisi chimiche degli inquinanti organici (IPA);
- Water Holding Capacity (WHC), per determinare la capacità di ritenzione idrica;
- Carbonio organico ed azoto totale, per la composizione della sostanza organica presente nel suolo e il suo grado di variabilità.

Analisi microbiche:

- Determinazione della biomassa microbica totale;
- Determinazione delle attività enzimatiche.

2.2.9. Risultati

Come visto nei capitoli precedenti, la pratica del fitorimedio è caratterizzata da sito–specificità, quindi l'applicazione e le prestazioni possono variare ampiamente in base ai parametri quali la contaminazione del suolo, la vegetazione presente, il tipo di suolo.

2.2.9.1. Caratterizzazione del sito sperimentale

Per valutare la messa a dimora delle piante, sono state raccolte alcune ulteriori informazioni sul suolo logisticamente idoneo per poter avviare la sperimentazione in campo.
Sono stati valutati i dati riguardanti il contenuto dei metalli presenti nel terreno, forniti dalla caratterizzazione preliminare realizzata all'interno del sito contaminato (CIGRA, 2006 - riferiti al D. M. 471/99) per verificare se vi potessero esser fenomeni di tossicità sui vegetali.
In particolare, i campionamenti fatti nel lotto OPP5, tra 0.50 e 0.70 m dal p.c., riportano superamenti per due specifici metalli, stagno e zinco.
L'*US – Environmental Protection Agency,* fornisce dei riferimenti riguardo i livelli di tossicità per zinco nei confronti di *Medicago sativa* L.
Non vi sono dati per il metallo stagno e non vi è alcun riferimento a *Vetiveria zizanioides* L.
Il valore fornito da (EPA, 2005) è riferito ad un dato di tossicità medio sulla base di letteratura scientifica, e tiene conto del pH del suolo e del contenuto di sostanza organica.

Tabella 2.2 - Livello di *screening* ecologico nel suolo per Zn, concentrazione limite per osservare evidenze di tossicità su *Medicago sativa* L.

	pH del suolo	Materia organica (%)	Concentrazione (mg/kg ss)
Medicago sativa L.	7.0	3.00	270

I livelli di contaminazione forniti dalla caratterizzazione preliminare corrispondono a 2.5 mg/kg ss per lo stagno e 150 mg/kg ss per lo zinco.

I limiti imposti dal D.M. 471/99 (Tab. 1, colonna A, riferiti ai siti residenziali), che corrispondono ai limiti riportati dalla Tabella 1, colonna A, del D.Lg. 152/2006 in materia di siti contaminati, sono 1 mg/kg ss per stagno e 150 mg/kg ss per zinco.

E' dimostrata dalla bibliografia la tolleranza di *Medicago sativa* L. alla contaminazione da metalli pesanti, e per questo motivo viene impiegata come specie estrattrice per questi inquinanti.

Basse dosi di metalli pesanti sono in grado di stimolare l'allungamento radicale e la germinazione, mentre a concentrazioni superiori a 40-50 ppm di Cd, Cu, Ni, Pb, si riduce la capacità di germinare. (Chhotu & Fulekar, 2008) hanno dimostrato che *Medicago sativa* L. è in grado di germinare e crescere in modo efficace a qualsiasi concentrazione di Zn valutata nelle studio da loro condotto (5, 10, 20, 40, 50 ppm), ad un pH del suolo utilizzato di 7.2 (Chhotu & Fulekar, 2008).

Esclusi problemi di tossicità per le piante, si è provveduto a caratterizzare ulteriormente il terreno per valutare in modo approfondito la sua idoneità alla messa a dimora delle specie scelte.

In base al triangolo tessiturale de *United States Department of Agriculture* (USDA), il terreno risulta essere "Franco".

Tabella 2.3 - Frazioni granulometriche che caratterizzano il suolo considerato

Classi diametriche	**Dimensione** (um)	**Frazione** (%)
Sabbia grossa	>200	18.4
Sabbia fine	20-200	21.5
Limo grosso	<50	12.5
Limo fine	<20	30.4
Argilla	<2	17.3

Il pH del suolo è stato misurato in tre periodi diversi (maggio, luglio e ottobre) dell'anno 2008, dando esiti non dissimili: 7.7, 7.5, 7.9. Essendo il territorio triestino caratterizzato dalla presenza di un'importante componente calcarea, il pH è tendenzialmente alcalino. Il calcare sciogliendosi mette in soluzione calcio e bicarbonato che esercitano un effetto tampone rispetto a piogge acide che depauperano il suolo dai nutrienti.

La concentrazione di fosforo assimilabile, il cui dato è stato acquisito da uno studio effettuato in parallelo a questo (della Torre, 2009) è 0.06 g/kg. Questo valore ci fornisce un'indicazione della concentrazione dell'elemento disponibile per le piante. Ad un pH che oscilla tra 7.5 e 7.9, come quello stimato nel suolo sperimentale, si ha una progressiva formazione di fosfati bi e tri - calcici molto insolubili.

Vetiveria zizanioides L. non richiede particolari condizioni tessiturali per svilupparsi. È ben documentata la sua resistenza a crescere in ambienti ostili, sia dal punto di vista delle caratteristiche fisiche del suolo che considerando i livelli della contaminazione. In Australia è usata per stabilizzare suoli altamente salini o suoli alcalini (pH 9.5) con elevato contenuto di carbone, ed ancora suoli acidi (pH 2.7) (Xia, 2004).

Medicago sativa L. sotto il profilo pedologico ha necessità di avere un terreno ben drenato per limitare il rischio di ristagno idrico. Predilige una tessitura da franca ad argillosa, anche se si adatta a terreni ricchi di sabbia, purché sufficientemente dotati di calcare ed ossido di potassio.

Non tollera invece terreni con reazione acida: con valori di pH inferiori a 6-6.5 la simbiosi rizobica si instaura con difficoltà e viene compromessa la durata del prato (Regione Emilia–Romagna, 2004).

Dalle considerazioni fatte in riferimento ai dati ottenuti, il sito OPP5 è stato considerato idoneo per la realizzazione della sperimentazione.

Il terreno colturale è stato opportunamente preparato per la messa a dimora della piante.

2.2.9.2. La contaminazione del suolo

L'attenzione è stata focalizzata, come detto, sulla degradazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) nel suolo da parte di *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L., specie per cui la letteratura riporta una attitudine a degradare composti organici come gli idrocarburi policiclici aromatici.

Sono state determinate le concentrazioni dei contaminanti nei mesocosmi ospitanti le due piante sia nella parte coltivata che nella porzione incolta.

I livelli di contaminazione riscontrati nel lotto OPP5 e forniti dalla caratterizzazione preliminare del sito (CIGRA, 2006), riportavano superamenti delle Concentrazioni Soglia di Comunicazione (C.S.C. riferite alla Tab. 1/A - Siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale dell'Allegato 1 – D.M. 471/99) per alcuni composti organici.

Tabella 2.4 - Concentrazioni e superamenti degli IPA rispetto al limite di legge (D.M. 471/99)

	CSC D.M.471/99 Limite 1-A (mg/kg ss)	**Conc. OPP5** (mg/kg ss)	**Conc/CSC**
Pirene	5	0.81	0.16
Crisene	5	0.78	0.15
Benzo[a]antracene	0.5	0.78	0.16
Benzo[b+k]fluorantene	0.5	1.63	3.26
Benzo[a]pirene	0.1	0.97	9.7
Indeno[1,2,3-cd]pirene	0.1	0.1	1.00
Dibenzo[a,h]antracene	0.1	0.1	1.00
Benzo[g,h,i]perilene	0.1	0.54	5.4

Le caratteristiche chimico-fisiche del suolo, oltre le condizioni logistiche del sito ci hanno spinto a considerare OPP5 un idoneo terreno di prova per la sperimentazione del fitorimedio *in situ*. Necessitavamo di un'area che riportasse una contaminazione di specie organiche e come mostrato dalla Figura 2.5, OPP5 aveva i giusti requisiti.

Il periodo di campionamento coincide per entrambe le specie. Sono stati fatti complessivamente tre campionamenti che corrispondono ai mesi di aprile 2007 (T_0), giugno 2007 (T_1) e settembre 2008 (T_2). A ciascun valore determinato dalle analisi chimiche è stata associata un'incertezza media del 30%, che corrisponde all'incertezza analitica riconducibile alla fase di preparazione del campione e al metodo di misura utilizzato (GC-MS), valutata sulla base della funzione di Horwitz (Thompson, M., 2004).

Successivamente all'Indagine Ambientale Preliminare realizzata da CIGRA nel 2006, è entrato in vigore il D.Lg. 152/06, pertanto i dati presentati sono riferiti ai limiti di legge nella colonna A, Allegato 5, parte IV, Titolo V.

Osservando i dati ottenuti dai campioni di suolo del lotto sperimentale di *Medicago sativa* L., distinguendo tra seminato e non seminato nei tre tempi di campionamento (T_0, T_1, T_2) si nota una netta distinzione tra le due condizioni. In particolare durante il primo campionamento (T_1); la parte seminata riporta una riduzione significativa della contaminazione per tutti gli IPA monitorati, ad eccezione di Benzo[b+k]fluorantene, che non presenta una distinzione apprezzabile tra le due condizioni, se si considera l'incertezza associata alla misura (Figura 2.10).

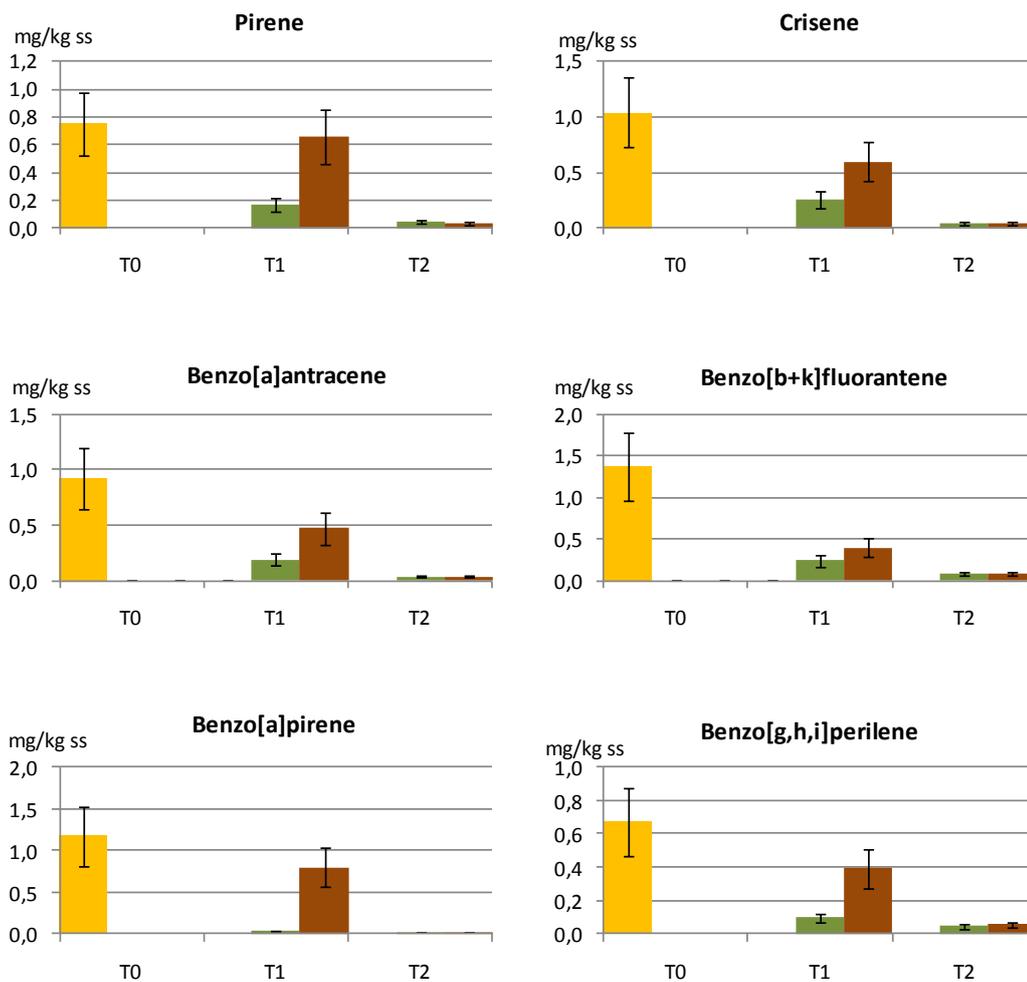



Figura 2.10 - Concentrazione (mg/kg ss) nel lotto sperimentale di *Medicago sativa* L. Vengono distinte le due condizioni suolo seminato e suolo incolto. Vi sono 3 gruppi di istogrammi che corrispondono a T_0 = giallo, T_1 e T_2 distinti per seminato (verde) e non seminato (marrone)

È possibile esprimere la *percentuale di attenuazione della contaminazione* per un certo intervallo temporale (da un tempo iniziale T_i, ad uno finale T_f) con la seguente formula:

$$\%ATTENUAZIONE = \left(1 - \frac{C(T_f)}{C(Ti)}\right) * 100$$

Se si confronta la somma degli IPA totali riscontrati nel suolo incolto al tempo iniziale (T_0) con quelli del suolo di *Medicago sativa* L. al primo campionamento (T_1), si registra una riduzione percentuale della concentrazione dell'84%.

Osservando le riduzioni percentuali per i singoli analiti monitorati su suolo coltivato ed incolto fra i campionamenti T_0 e T_1, è possibile dedurre che *Medicago sativa* L. sia in grado di influenzare la degradazione dei contaminanti organici monitorati, visto l'effetto osservato in presenza della pianta Figura 2.11.

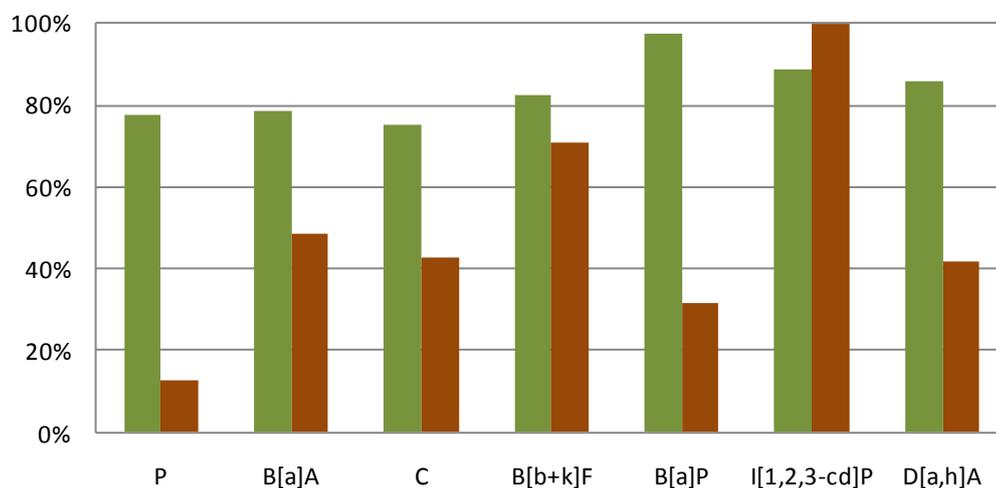



Figura 2.11 - Attenuazione % della concentrazione degli IPA nel lotto sperimentale di *Medicago sativa* L. tra il tempo iniziale (T0) ed il primo campionamento (T1), dopo la semina della pianta. Si evidenzia la distinzione tra suolo coltivato (verde) e suolo (marrone)

Eccezione viene fatta per Indeno[1,2,3–cd]pirene che mostra una maggior riduzione della concentrazione degli IPA nella parte incolta. Un fattore determinante per descrivere le dinamiche di degradazione è la solubilità dei contaminanti nella fase acquosa del suolo. Appare evidente che composti aventi caratteristiche come quelli da noi monitorati sono difficilmente resi disponibili e disciolti nella frazione acquosa.

Se si confrontano le somme degli IPA totali nel suolo coltivato a *Medicago sativa* L. tra il primo (T_1) ed il secondo (T_2) campionamento, la riduzione percentuale della contaminazione risulta essere del 71%.

I valori dei singoli IPA monitorati durante il secondo campionamento sia nel suolo coltivato che incolto non mostrano differenze tra le condizioni, tutti gli otto congeneri sono scesi sensibilmente sotto il limite di legge.

Come è stato discusso nel capitolo introduttivo, il contributo della componente microbica riveste un ruolo fondamentale nella degradazione dei contaminanti organici nel suolo.

La maggior riduzione degli IPA in presenza di pianta, ci fa supporre che questa sia in grado di migliorare qualitativamente il suolo e indurre processi degradativi. Le analisi effettuate per la determinazione della biomassa microbica totale (cfr. Appendice A.3.1., Bc – *biomass carbon*) eseguite ad ottobre 2008 (espresso in µg di C per g di suolo secco), che confrontano le due condizioni, suolo seminato ed incolto, mostrano una maggiore quantità di Bc nella porzione rizosferiale (586 µg g^{-1}) se confrontato con il suolo incolto (463 µg g^{-1}). Anche i dati dell'attività enzimatica (espressi in µg di FDA per g di suolo secco per ore di incubazione) appaiono concordi con l'ipotesi che la pianta aumenti le attività microbiche totali: il suolo con medica riporta valori di 5.39 µg g^{-1} h^{-1} contro valori di 4.20 µg g^{-1} h^{-1} in assenza di pianta.

Osservando il lotto sperimentale di *Vetiveria zizanioides* L. si nota anche in questo caso, una maggiore riduzioni della contaminazione in presenza della pianta, come viene rappresentato nei grafici a seguire. Tra gli otto IPA monitorati, Benzo[b+k]fuorantene e Benzo[a]pirene mostravano superamenti del limite di legge (Tab. 1, colonna A, Allegato 5, Parte IV, Titolo V, D. Lgs 152/2006) rispettivamente di 3 e 9 volte (Tabella 2.4). Ciò che si osserva è che già dopo il primo campionamento, i livelli di contaminazione per questi due composti sono scesi sotto il limite che è di 0.5 mg/kg per B(b+k)F e 0.1 mg/kg per B(a)P.

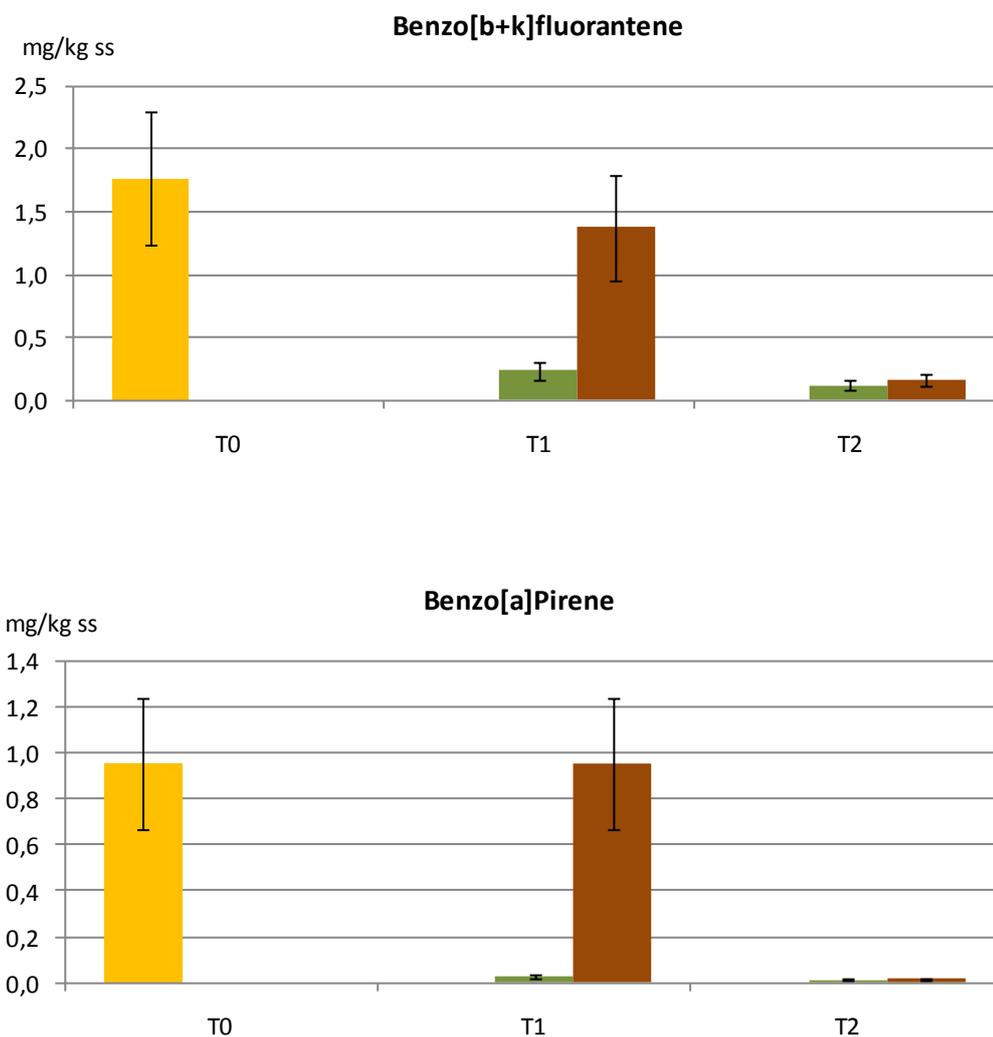



Figura 2.12 - Concentrazione di Benzo[b+k]fluorantene e Benzo[a]pirene nel lotto sperimentale di *Vetiveria zizanioides* L. confrontati nei tre campionamenti T0, T1, T2 e tra le condizioni sperimentali coltivato (verde) incolto (marrone)

In tutti i casi, gli IPA al secondo campionamento non evidenziano differenze significative di concentrazione tra suolo con pianta e terreno nudo. Se si considera la percentuale di attenuazione della contaminazione, tra il tempo iniziale (T_0) ed il primo campionamento (T_1), vetiver mostra una riduzione di concentrazione degli IPA totali tra 80 e 100%.

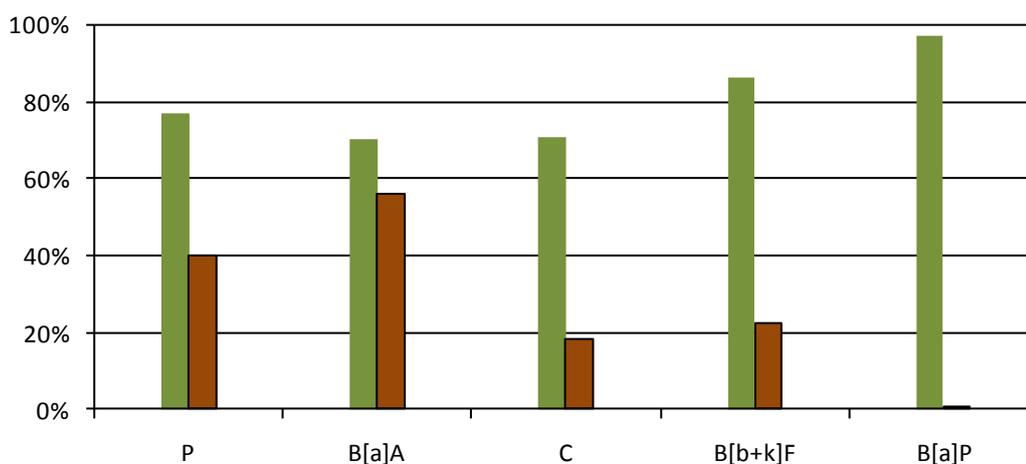



Figura 2.13 - Attenuazione % della concentrazione degli IPA nel lotto sperimentale di *Vetiveria zizanioides* L. tra il tempo iniziale (T0) ed il primo campionamento (T1), dopo due mesi dalla messa a dimora della pianta. Si evidenzia la distinzione tra suolo coltivato (verde) suolo incolto (marrone)

2.2.9.3. Componente microbica

Esaminando i dati della componente microbica totale, contrariamente a quanto ci si attendeva e a quanto è stato osservato per *Medicago sativa* L., la porzione incolta riporta un valore più elevato (496 µg g^{-1}) rispetto al suolo coltivato con vetiver (396 µg g^{-1}). Anche l'analisi che stabilisce l'attività enzimatica totale sembra confermare il dato, riportando valori superiori, anche se minimi, nella parte incolta (4.63 µg g^{-1} h^{-1}) rispetto alla porzione coltivata (3.59 µg g-1 h^{-1}).

Nel considerare le variazioni della componente microbica tra suolo seminato ed incolto è opportuno considerare i fattori che naturalmente portano a determinare degli stress alla popolazione presente con conseguente decrescita.

Per stabilire le cause effettive che determinano alterazioni della popolazione microbica del suolo sarebbe opportuno monitorare parametri come ad esempio fluttuazioni della temperatura, dell'umidità del terreno, variazioni del pH, disturbi fisici del suolo, incremento dei predatori e antagonisti, diminuzione dei nutrienti, tutti parametri che possono determinare delle alterazioni in termini quantitativi (Brookes, 1995).

2.2.9.4. Sostanza organica e rapporto C/N

È possibile determinare la sostanza organica per via indiretta sulla base del contenuto di carbonio organico moltiplicandolo per un fattore di conversione (1.724, fattore di Van Bemmelen) (Jackson, 1964).

È bene considerare questo parametro come valore indicativo, in quanto la sostanza organica ha una grande variabilità all'interno del suolo.

Nel lotto sperimentale ospitante vetiver, la porzione non coltivata riporta valori di 12.1 g/kg di carbonio organico e 20.9 g/kg di sostanza organica. Il suolo con pianta mostra valori maggiori, 14.3 g/kg di carbonio organico, conseguentemente e 24.7 g/kg di sostanza organica.

Jenkinson e Ladd (1981) hanno affermato che l'accumulo di sostanza organica provoca generalmente un aumento della biomassa microbica, indicando che il 2% (valore medio) del carbonio organico nel terreno è dato dalla biomassa microbica.

La rotazione colturale può avere effetti positivi sul contenuto di carbonio organico dei suoli. Terreni soggetti a rotazione mostrano valori percentuali di carbonio organico superiore (3%) a quelli dei terreni monoculturali (2.3%), inoltre anche il quantitativo di azoto microbico è soggetto ad aumento. È stato dimostrato che le pratiche agronomiche hanno un'influenza diretta sul rapporto C_{micr}/C_{org} (Nannipieri, 1993).

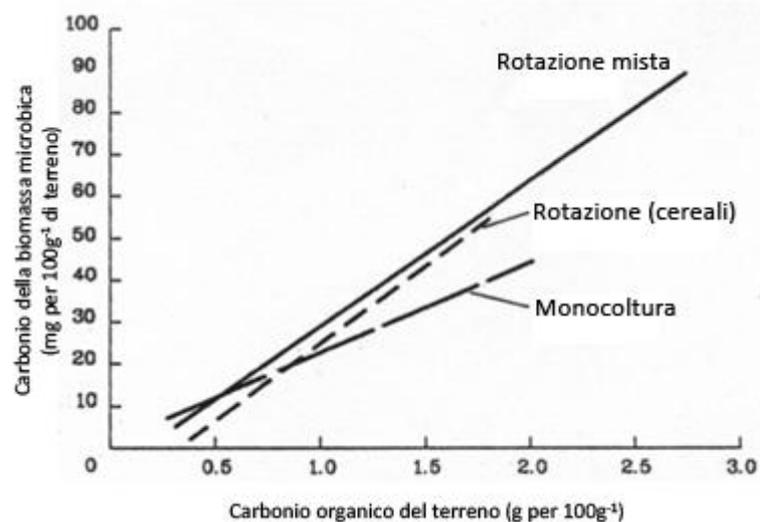



Figura 2.14 - Confronto tra le regressioni lineari C_{mic} – C_{org} in terreni prelevati da sistemi colturali diversi (Monificato da Anderson e Domsch, 1986)

Il rapporto C/N del suolo coltivato a vetiver e della porzione contigua è compreso tra 10 e 11, valore che indica quindi c'è equilibrio tra la sostanza organica umificata e mineralizzata (Sbaraglia & Lucci, 1994).

Medicago sativa L. e *Vetiveria zizanioides* L. non hanno manifestano evidenze di patologie o condizioni di stress. Sono piante che ben si sono adattate alla condizione del suolo, hanno mostrato grande resistenza alle condizioni climatiche ed inoltre hanno richiesto pochi interventi colturali, salvo un diserbo manuale costante.

Visti i risultati conseguiti è possibile affermare che è stata realizzata una buona progettazione preliminare; l'identificazione del sito, la valutazione del terreno e la scelta delle piante hanno portato ad esiti positivi.

Una delle strade percorribili in futuro potrebbe esser la realizzazione di un impianto a rotazione colturale, che come dimostrato, potrebbe migliorare la qualità del suolo in termini chimico–fisici. Inoltre, scegliendo essenze vegetali di spiccato interesse estetico, l'ambiente potrebbe migliorare anche sotto il profilo paesaggistico.

2.3. Rizodegradazione di Idrocarburi Policiclici Aromatici in serra

Dopo i risultati delle sperimentazioni in campo su terreni moderatamente contaminati, si è orientata la sperimentazione verso il trattamento di suoli con contaminazione da IPA più elevate in serra, al fine di operare in condizioni maggiormente controllate. Volevamo monitorare con maggiore dettaglio parametri ambientali come la temperatura, l'umidità e l'irrigazione.

Si è identificata un'area che avesse condizioni di contaminazione adeguati per gli obiettivi prefissati, concentrazioni che mostrano superare il limite di legge in modo significativo per alcuni IPA (Tabella 2.5).

Tabella 2.5 - Concentrazioni (mg/kg ss) e superamenti degli IPA nel sito S3 rispetto al limite di legge (D.Lgs. 152/06)

	CSC ex. D.Lgs. 152/06 Limite 1-A (mg/kg ss)	**Conc. S3** (mg/kg ss)	**Conc. / CSC**
Pirene	5	0.8	0.16
Crisene	5	0.64	0.13
Benzo[a]antracene	0.5	0.59	1.20
Benzo[b+k]fluorantene	0.5	1.54	3.09
Benzo[a]pirene	0.1	1.3	13.02
Indeno[1,2,3-cd]pirene	0.1	1.11	11.10
Dibenzo[a,h]antracene	0.1	0.72	7.17
Benzo[g,h,i]perilene	0.1	0.20	1.96

L'area identificata è collocata logisticamente in una posizione difficile, dove l'accessibilità a fonti idriche si presentava complessa. Inoltre l'esposizione al sole è risultata piuttosto limitata con una forte componente vegetazionale arborea che limitava la gestione del sito, e anche ciò ha contribuito ad orientare la scelta verso la sperimentazione in serra.

Si è scelto di allestire un numero di vasi sufficienti per prelevare tre repliche ad ogni campionamento. Questo è da ricondursi, come vedremo a breve ad una ragione di modifica alle procedure di campionamento del suolo, ma anche per alterare il meno possibile, differentemente dalla procedura *in situ*, la relazione suolo–pianta.

Al fine di ottimizzare le procedure volte a caratterizzare le dinamiche suolo–contaminanti e suolo–pianta, e considerando l'eterogeneità della matrice suolo, sono stati apportati alcuni

miglioramenti alle procedure di campionamento. Operativamente, sono state effettuate le analisi degli analiti in campioni indipendenti. Ogni campionamento prevedeva l'esecuzione di tre repliche distinte per ciascuna condizione sperimentale su ciascuna delle quali, sono state successivamente eseguite le analisi di laboratorio.

La specie impiegata per questo lavoro è stata *Medicago sativa* L. visti gli esiti positivi forniti dalla sperimentazione in campo. Inoltre la scelta di operare in serra, ci ha fatto escludere *Vetiveria zizanioides* L., considerandone l'imponente struttura, che male si presta ad essere coltivata in vaso.

Secondo Shuxiu F. et al, 2008, uno dei parametri che influenza in modo determinante la degradazione degli IPA per *Medicago sativa* L. è la sostanza organica del suolo (Shuxiu, Peijun, Zongqiang, Wanxia, & Na, 2008). Pertanto si è deciso di determinare il contenuto di carbonio organico totale ad ogni campionamento per verificare l'influenza che questo fattore ha sulle dinamiche degradative.

2.3.1. Piano sperimentale

S3, è la denominazione data all'area con contaminazione idonea, di cui sono state fornite sopra le indicazioni sulle concentrazioni di IPA; si colloca a sud del sito contaminato, non troppo distante dall'impianto di incenerimento e localizzato a ridosso della strada (Figura 2.5). Questo sito presentava superamenti delle Concentrazioni Soglia di Contaminazione per quasi tutti gli otto IPA considerati (Tab. 1, colonna A, allegato 5, Parte IV, Titolo V del D.Lgs. 152/2006).

È stato prelevato un quantitativo di terreno pari a 50 kg, setacciato e privato della componente più grossolana, omogeneizzato e posto in vasi di materiale plastico (PET) di capacità pari a 1 kg e profondità 20 cm. E' stato testato il materiale plastico dei vasi per verificare l'assenza di IPA come potenziali contaminanti.

I vasi sono stati posizionati su file parallele all'interno della serra e in ognuno di questi è stato seminato un quantitativo pari a 2 g di semi di *Medicago sativa* L. La semina è stata effettuata ad una settimana di distanza dall'allestimento dei vasi, per consentire al sistema suolo di acclimatarsi.

I semi sono stati ricoperti da un sottile strato di terreno e adeguatamente bagnanti per indurre la germinazione.

Dopo circa dieci giorni le giovani piante hanno emesso i cotiledoni.

La sperimentazione ha avuto inizio il mese di aprile 2009.

2.3.2. Piano di campionamento

L'arco temporale complessivo della sperimentazione è stato di sei mesi. Sono stati eseguiti sei campionamenti con cadenza mensile, tranne il primo che è stato eseguito a quindici giorni dalla data d'inizio.

A seguire un dettaglio del piano di campionamento:

Tabella 2.6 - Sigle, date e condizioni del suolo campionato (NS = suolo incolto, S = suolo coltivato)

Sigla	Data campionamento	Condizioni sperimentali suolo campionato
T0	14/4/2009	S
T1	4/5/2009	NS
T2	18/5/2009	S/NS
T3	5/6/2009	S/NS
T4	20/7/2009	S/NS
T5	24/8/2009	S/NS
T6	21/9/2009	S/NS

Ogni campionamento prevedeva l'esecuzione delle analisi su tre repliche distinte.

Le condizioni sperimentali si distinguevano in:

1. vasi contenenti terreno contaminato coltivato a medica;
2. vasi contenenti terreno contaminato incolto;
3. vasi contenenti suolo non contaminato coltivato a medica.

Ad ogni campionamento sono stati registrati parametri biometrici come il peso della biomassa prodotta e la lunghezza di foglie e radici.

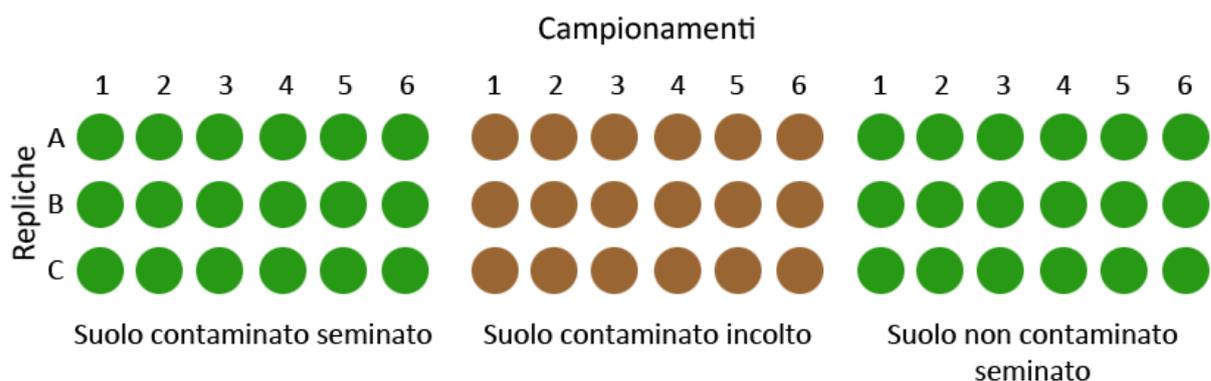



Figura 2.15 - Rappresentazione dei vasi nelle diverse condizioni sperimentali con le rispettive repliche (A, B, C) per ciascuna condizione (suolo contaminato; suolo incolto)

2.3.3. Allestimento della serra sperimentale

Ai fini sperimentali è stata allestita una serra fredda (5 x 7.5m) ubicata all'interno del sito contaminato.

Tale struttura ospitava all'interno banconi sui quali sono stati posizionati i vasi sperimentali. E' stata dotata di un impianto di irrigazione digitalizzato, con una centralina computerizzata che garantiva l'irrigazione nelle fasce orarie stabilite e di un sistema di rilevamento di temperatura e umidità relativa (OM-EL-2-LCD). Questo sistema, ancorato sotto uno dei banconi che sostenevano i vasi, ha permesso di registrare in continuo la temperatura e l'umidità dell'aria all'interno della serra durante tutto l'arco della sperimentazione, segnalando le criticità dovute ai picchi di temperatura stagionali.

A tal riguardo, dal mese di giugno, è stato posizionato un telo ombreggiante sulla parte sommitale della serra, per limitare l'insolazione e le alte temperature evidenziate all'interno della struttura.

2.3.4. Piano delle analisi

Ad ogni campionamento i vasi sono stati prelevati e trasportati ai laboratori del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Trieste. Il terreno e la pianta sono stati trattati al fine di separare la matrice vegetale ed il suolo. Quest'ultimo è stato setacciato con

setaccio a maglia 2mm e preparato per le analisi. Le piante sono state pulite, pesate, lavate, e sono stati raccolti i dati biometrici.
Ad ogni campionamento sono state eseguite le seguenti analisi:

- determinazione IPA nel terreno con pianta / senza pianta;
- determinazione del carbonio e azoto totale;
- determinazione della biomassa microbica del suolo;
- determinazione delle attività enzimatiche;
- test di fitotossicità;
- annotazione delle misure biometriche (lunghezza apparato epigeo ed ipogeo e peso);
- determinazione IPA nei tessuti di *Medicago sativa* L., al tempo iniziale e finale.

2.3.5. Risultati

2.3.5.1. La contaminazione del suolo

In Figura 2.16 si riportano gli istogrammi con valori medi e deviazioni standard per le concentrazioni degli IPA considerati per i campionamenti effettuati nell'arco della sperimentazione, per il suolo seminato e per quello non seminato. L'esame dei dati non mostra alcun *trend* di decontaminazione significativo , né alcuna influenza della pianta sui processi degradativi (differenza tra concentrazioni per il suolo inerbito e non).
Per il suolo non inerbito, uno solo dei congeneri, Benzo[g,h,i]perilene costituito da sei anelli benzenici, mostra una diminuzione significativa tra il tempo iniziale e l'ultimo campionamento (T_6). Emerge nel complesso, una variabilità piuttosto elevata nelle concentrazioni dei contaminanti rilevati nei vasi sia inerbiti che non inerbiti. Per gli IPA, in particolare per i lotti inerbiti si osservano addirittura incrementi nelle concentrazioni medie.

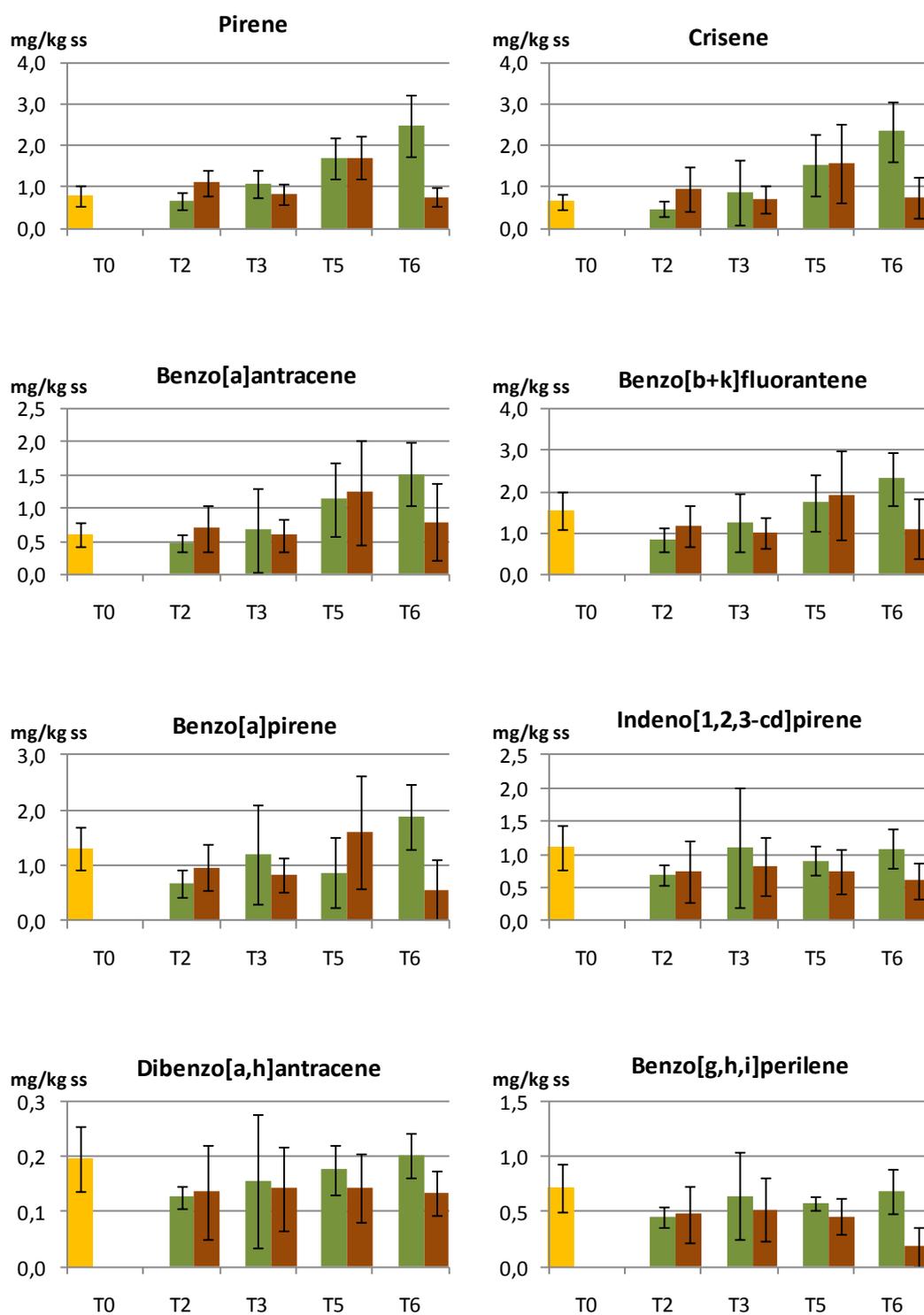



Figura 2.16 - Concentrazione degli IPA (mg/kg ss) in ciascuna condizione sperimentale suolo seminato (verde) ed incolto (marrone) in relazione al tempo (T_0, T_2, T_3, T_5, T_6). Ogni istogramma rappresenta il valore medio di tre repliche, e viene indicata la deviazione std.

La relazione esistente tra le variabili IPA e il tempo e' stata testata tramite il coefficiente di correlazione non parametrico *Rho* di Spearman separatamente nelle due condizione "seminato" e "non seminato" . Il Rho di Spearman indica una correlazione debolmente negativa (*Rho* = -0.524, p = 0.045) nella condizione di "non seminato" per quel che riguarda l'analita Benzo[g,h,i]perilene; dalla Figura 2.16 si può osservare come il valore misurato al tempo T_6 risulti significativamente inferiore a valore iniziale. Nella condizione di seminato, invece, quasi tutti i parametri IPA aumentano in maniera del tutto inattesa la loro concentrazione nel tempo. Da questa prima elaborazione si evince che la condizione seminato influenza in modo particolare la concentrazione degli IPA nel suolo e la loro evoluzione nel tempo.

Allo scopo di indagare meglio sulle incidenze dei due fattori, condizione (seminato e non seminato) e tempo, sulle concentrazioni degli inquinanti, e' stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie i cui risultati sono riportati nella Tabella 2.7; si riporta la significavità dei fattori considerati (tempo, df = 4; condizione, df = 1; condizione*tempo, df = 4) per le analisi ANOVA condotte per gli IPA.

Ciò che si osserva, è un effetto sinergico del fattore tempo sulla concentrazione di quattro congeneri P, C, B(a)A e B(b+k)F. Semplificato il modello per mezzo dell'esclusione delle interazioni a due vie, l'effetto del singolo fattore condizione sulla concentrazione risulta non significativo per nessuno dei parametri, mentre l'effetto del tempo*condizione sulla concentrazione dei contaminanti risulta essere significativo per P e C ed è al limite della significatività per B(b+k)F.

Tabella 2.7 – Risultati delle analisi ANOVA a due vie per i fattori condizione, tempo e tempo*condizione e la loro interazione per ciascun IPA considerato. In grassetto i p-value mostrano significatività statistica ($p < 0.05$).

Sorgente	Variabile dipendente	df	F	p
tempo	P	4	5.361	**.004**
	C	4	6.961	**.001**
	B(a)A	4	5.261	**.005**
	B(b+k)F	4	3.184	**.035**
	B(a)P	4	1.981	.136
	I(1,2,3-cd)P	4	1.270	.315
	B(g,h,i)P	4	1.594	.215
	D(a,h)A	4	1.629	.206
CONDIZIONE	P	1	3.274	.085
	C	1	3.348	.082
	B(a)A	1	.648	.430
	B(b+k)F	1	1.091	.309
	B(a)P	1	1.011	.327
	I(1,2,3-cd)P	1	2.186	.155
	B(g,h,i)P	1	2.171	.156
	D(a,h)A	1	1.550	.227
tempo * CONDIZIONE	P	4	4.790	**.007**
	C	4	5.061	**.006**
	B(a)A	4	1.875	.154
	B(b+k)F	4	2.406	**.084**
	B(a)P	4	2.096	.119
	I(1,2,3-cd)P	4	.644	.638
	B(g,h,i)P	4	.691	.607
	D(a,h)A	4	.675	.617

Osservando l’attenuazione percentuale della concentrazione di IPA nel suolo in relazione ai sei mesi sperimentali, come illustrato in Figura 2.17, unicamente il suolo incolto mostrerebbe una riduzione della contaminazione.

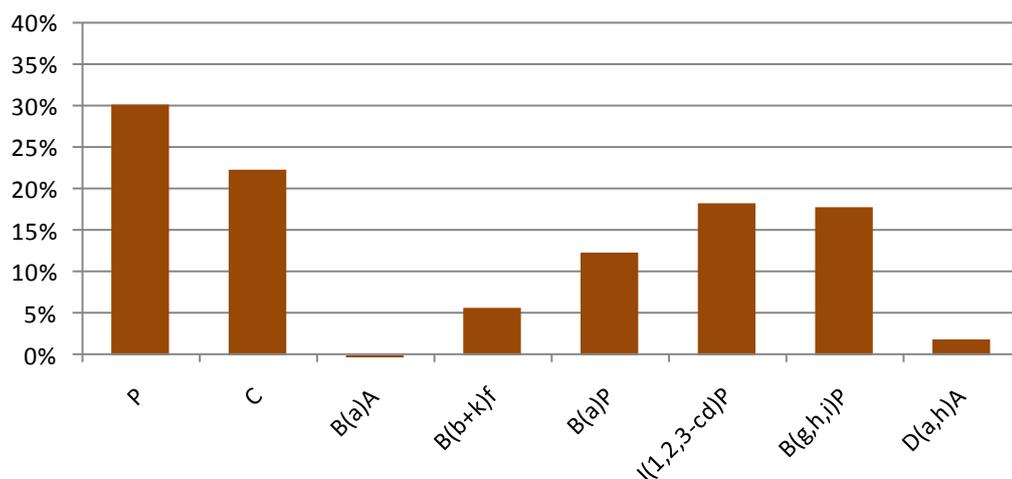



Figura 2.17 - Attenuazione % della concentrazione degli IPA nel suolo coltivato con *Medicago sativa* L. relativamente al periodo maggio – settembre 2009

Questo fenomeno si è manifestato anche durante la sperimentazione di rizodegradazione per *Festuca arundinacea* L. condotta in parallelo alla presente per il Dottorato di ricerca della Dr. Chiara della Torre (Della Torre, 2009).

Il fatto che non siano rilevati fenomeni di mitigazione della contaminazione può ricondursi alle condizioni non ottimali in cui le piante si sono sviluppate nella serra. Come precedentemente introdotto condizioni come umidità del suolo e temperatura influenzano il sistema suolo - pianta e determinano l'equilibrio tra componente microbica e pianta, quindi condizionano i processi degradativi degli inquinanti. Grazie all'applicazione del rilevatore di temperatura in serra, si è potuto constatare che i mesi di luglio e agosto sono stati caratterizzati da alte temperature, che hanno superato i 40°C. Altro fattore che potrebbe aver influito sull'esito della sperimentazione è l'acqua. L'impianto di irrigazione automatico che entrava in azione per circa per soli 20 min al giorno, al mattino e alla sera, a volte causava degli scompensi idrici. Questo fattore si suppone abbia influito negativamente sul sistema. Gli incrementi di concentrazione di IPA relativamente leggeri, evidenti in Figura 2.16, invece sono riconducibili a contaminazioni indesiderate, e di difficile interpretazione; essendo meglio visibili per i terreni inerbiti, si potrebbero imputare a intercettazione di IPA semivolatili da combustioni avvenute in prossimità della serra, da parte degli apparati aerei

delle piante che farebbero ricadere gli IPA al suolo. Una strada, pur non molto trafficata, è presente a poca distanza dalla serra sperimentale.

2.3.5.2. Concentrazione di IPA nei tessuti vegetali

Anche dall'analisi dei tessuti di *Medicago sativa* L. si nota una concentrazione relativamente elevata dei contaminanti nella parte epigea delle piante. Si suppone che vi sia stato un effetto di deposizione degli IPA prodotti dal traffico autoveicolare. È dimostrato che le piante siano in grado di concentrare gli IPA, sulle foglie, che rimangono adesi alla cuticola (Wang, Tao, Jiao, Coveney, Wu, & Xing, 2008).
Si osserva al tempo iniziale (T_1) una forte concentrazione dei contaminanti nei tessuti di *Medicago sativa* L., tutti i congeneri, eccetto Pirene e Benzo[a]antracene si presentavano sopra il limite di legge. Si suppone che l'impianto di irrigazione a pioggia entrato in azione solo dopo il secondo mese di sperimentazione, abbia dilavato i contaminanti prima adesi nella foglie trasferendoli in parte nel suolo. Questo spiegherebbe anche i valori insoliti ottenuti dalle analisi sul suolo, che registrano un'anomalia nei vasi coltivati con *Medicago sativa* L., evidenziando un trasferimento di contaminazione dal comparto atmosferico al suolo, e la necessità di controllare le concentrazioni degli IPA nell'aria. Si sono attivate collaborazioni con l'Università di Udine (Prof. Luca Marchiol) per la valutazione dell'intercettazione di IPA aerodispersi da parte di specie vegetali impiegate nel verde pubblico.
Per questo studio, la media complessiva dell'attenuazione della concentrazione sulle foglie tra primo e sesto campionamento per tutti i congeneri è del 97%.

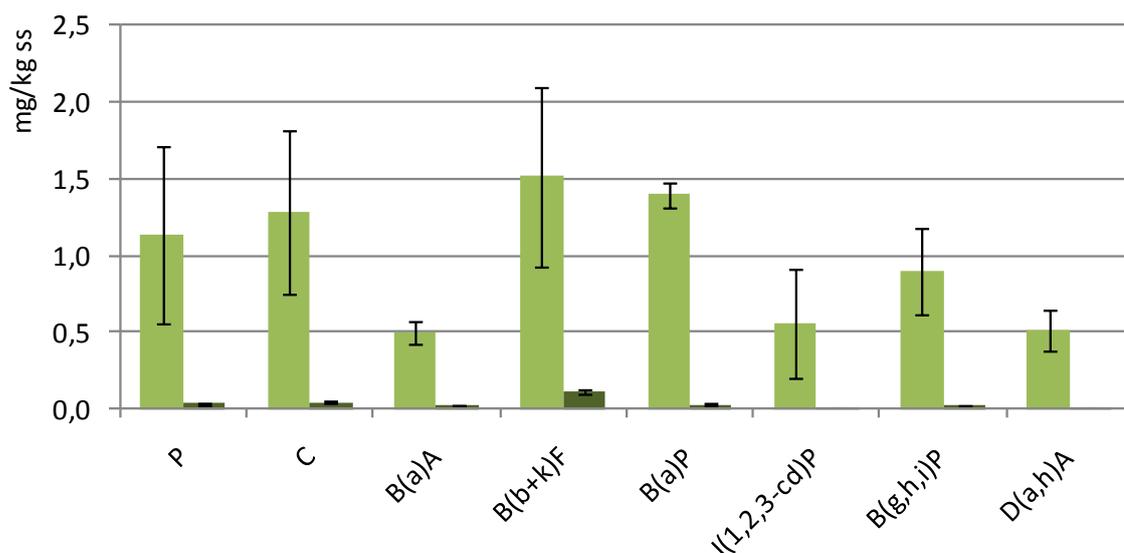



Figura 2.18 - Concentrazione degli IPA nei tessuti di *Medicago sativa* L. Vengono riportate le concentrazioni (mg/kg ss) del primo campionamento (T1, verde chiaro) e del sesto (T6, verde scuro)

È stato applicato il Test t–Student alle medie dei campioni nei due tempi (T_1, T_6). La riduzione di tutti i congeneri è risultata essere statisticamente significativa (t = 6.3796; G.L. = 14; p = .000)

2.3.5.3. Dati biometrici

Durante ogni campionamento sono stati registrati i dati biometrici delle piante, distinte per peso fresco totale (g), lunghezza dell'apparato epigeo ed ipogeo (cm).

Il peso fresco della biomassa aumenta durante i primi tre mesi di sperimentazione, dove le condizioni meteo si presentavano più idonee allo sviluppo e la serra non era esposta ad elevate temperature: il mese di maggiore rigoglìo corrisponde a giugno. Il peso diminuisce nel mese di luglio, mese caratterizzato da forte insolazione. All'innalzarsi delle temperature si verifica una perdita d'acqua dai tessuti. Negli ultimi tre mesi il peso rimane costante. Nel grafico (Figura 2.19), la barra BM6 corrisponde a *Medicago sativa* L. cresciuta in un suolo non contaminato: non si osservano effetti inibitori sulla crescita delle piante.

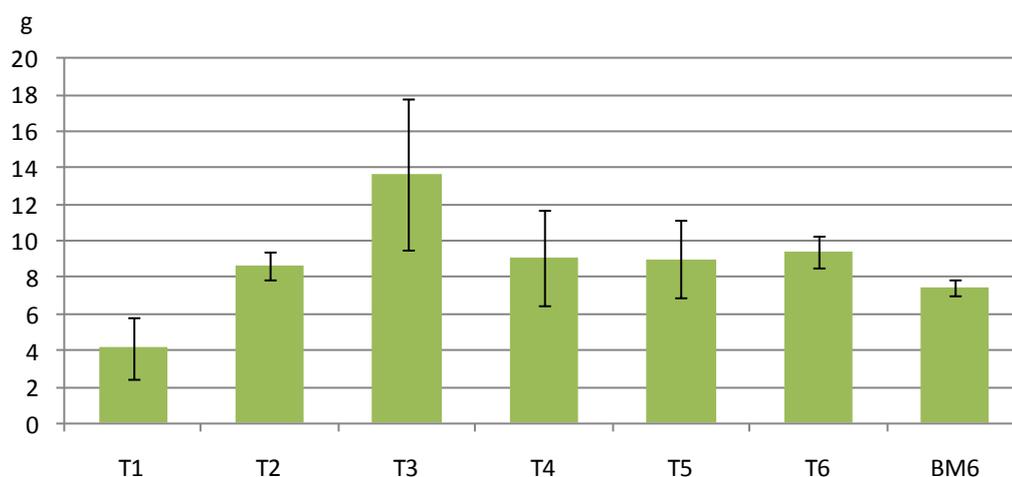



Figura 2.19 - Peso fresco (g) della biomassa vegetale nei sei campionamenti (maggio – settembre 2009). Il peso è calcolato come media tra le tre repliche di campioni

Osservando la lunghezza di radici e foglie, anche in questo caso, non si notano influenze negative della contaminazione sull'accrescimento. Se confrontiamo questi dati con quelli di *Medicago sativa* L. cresciuta in suolo pulito, osserviamo che non ci sono riduzioni di taglia.

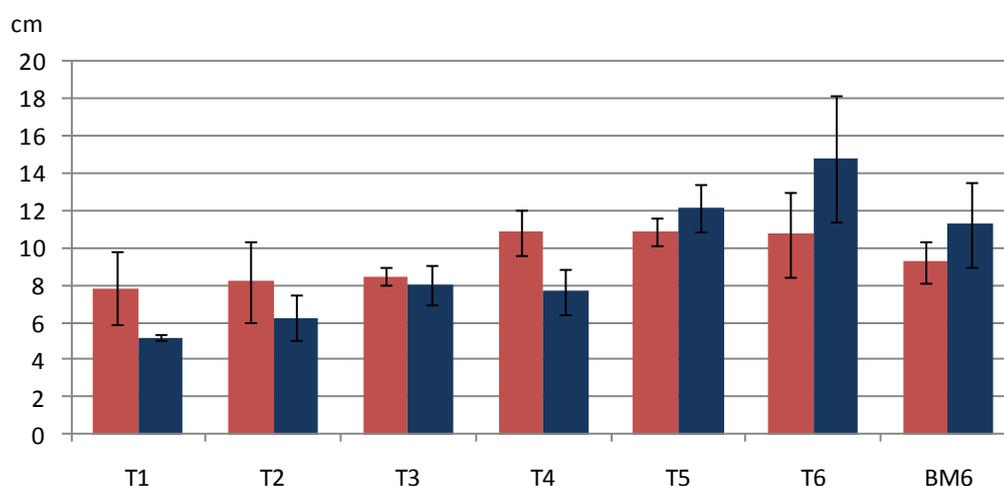



Figura 2.20 - Lunghezza (cm) degli apparati radicali e fogliari di *Medicago sativa* L.

L'allungamento dell'apparato radicale prosegue fino al mese di luglio, per poi rimaner costante il mese di agosto e settembre; la parte epigea registra maggior sviluppo negli ultimi due mesi di sperimentazione (agosto, settembre).

Fattori che influenzano lo sviluppo vegetativo di *Medicago sativa* L. sono la densità di semina e la profondità del suolo. Il vaso impiegato per la coltivazione delle piante può aver avuto un effetto limitante sulla crescita, considerati i 20 cm di profondità disponibili per la sviluppo radicale.

2.3.5.4. Carbonio organico

Il contenuto di carbonio organico (C_{org}) è influenzato dalla vegetazione e dalla gestione che il suolo ha avuto. Il carbonio organico relativo alla biomassa microbica (C_{mic}) generalmente è 1–3% del C_{org} totale (Nannipieri & Benedetti, 2003).
Le variazioni di carbonio organico (G.L. 11; t = 1.3632; p = 0.2001) e di azoto totale (G.L. = 11; t = 1.2131; p = 0.2505) sulla base del t–Student, non sono state significative, sia sulla base del tempo che sulla base delle condizioni sperimentali.

Tabella 2.8 - Carbonio organico e azoto totale distinti nelle due condizioni sperimentali (suolo incolto / suolo con *Medicago sativa* L.). Sono stati realizzati sei campionamenti a distanza di un mese uno dall'altro, il periodo è stato aprile - settembre 2009

	Terreno incolto				**Terreno con *Medicago sativa* L.**			
Tempo	**C % medio**	**dev.std.**	**N % medio**	**dev.std.**	**C % medio**	**dev.std.**	**N % medio**	**dev.std.**
T0	1.73	/	0.32		/	/	/	/
T1	2.23	0.11	0.29	0.06	2.39	0.21	0.17	0.00
T2	1.87	0.14	0.15	0.01	2.10	0.36	0.12	0.00
T3	2.29	0.41	0.14	0.02	2.06	0.09	0.12	0.01
T4	1.69	0.11	0.11	0.02	2.33	0.11	0.15	0.01
T5	1.89	0.27	0.10	0.01	1.78	0.12	0.12	0.01
T6	1.90	0.10	0.14	0.01	2.03	0.17	0.12	0.00

Dal rapporto C/N si nota che i processi di mineralizzazione sono pressoché nulli (*ratio* C/N > 11), l'azoto della sostanza organica viene immobilizzato. Quindi si sono verificati per lo più processi di umificazione e di conseguenza una sottrazione di azoto minerale da parte dell'attività microbica.

2.3.5.5. Biomassa microbica (B_c)

Il contenuto della biomassa della microbica mostra che non vi sono differenze tra il suolo seminato e incolto durante tutti i sei mesi sperimentali.

I valori di B_c variano in base all'uso a cui viene sottoposto il suolo: terreni arabili hanno un contenuto di biomassa microbica inferiore ai terreni forestali, che a loro volta hanno un contenuto inferiore di quelli a prato (Nannipieri, 1993).

Il suolo impiegato per la sperimentazione probabilmente è stato alterato durante le fasi di preparazione ed allestimento dei vasi. Le condizioni a cui è stato sottoposto hanno sicuramente influito sull'ecosistema suolo e forse i sei mesi sperimentali non sono stati sufficienti perchè la popolazione microbica si accrescesse e adattasse sufficientemente.

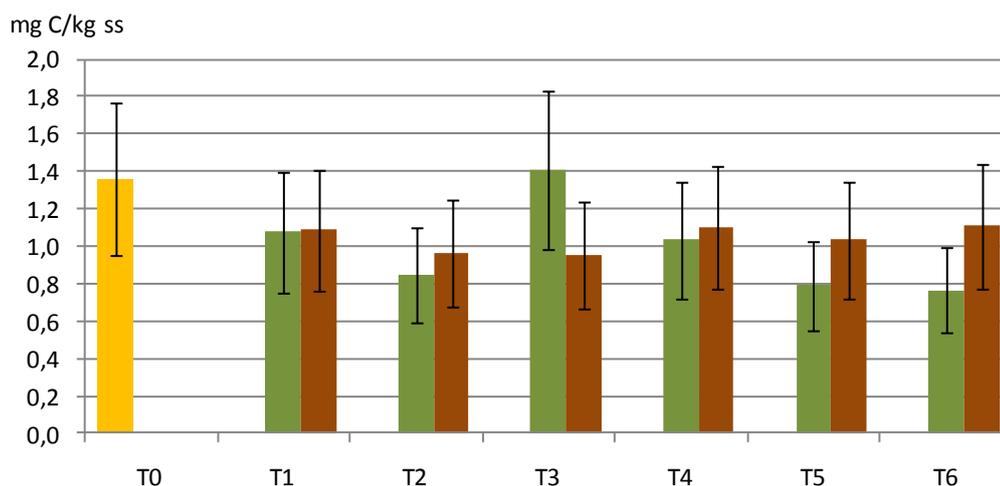



Figura 2.21 - Biomassa microbica totale (mg C/kg ss) nelle due condizioni sperimentali, suolo seminato (verde), suolo incolto (marrone) durante i sei mesi di sperimentazione. La barra gialla corrisponde al suolo incolto al tempo iniziale (T_0)

L'indice di correlazione Rho di Spearman mostra che la B_c diminuisce significativamente con l'avanzare del tempo sia per la condizione di suolo seminato (Rho = -.593**; Sig. (2 - code) .046; N = 18), che per la condizione di suolo non seminato (Rho = -.835**; Sig. (2 – code) .000); N = 21).

(** La correlazione è significativa al livello 0,01 (2-code))

Dall'osservazione della Figura 2.22 non si nota un andamento regolare nei vasi con pianta, comunque è possibile osservare l'influenza positiva di *Medicago sativa* L. rispetto alla popolazione microbica. È probabile che anche in questo caso, l'impianto di irrigazione abbia penalizzato il sistema suolo. Si nota che la brusca diminuzione corrisponde dopo il terzo campionamento, con l'entrata in funzione dell'impianto. Eventi di ristagno possono aver gravato sulla sopravvivenza della componente microbica, influendo su fenomeni di riduzione del contenuto.

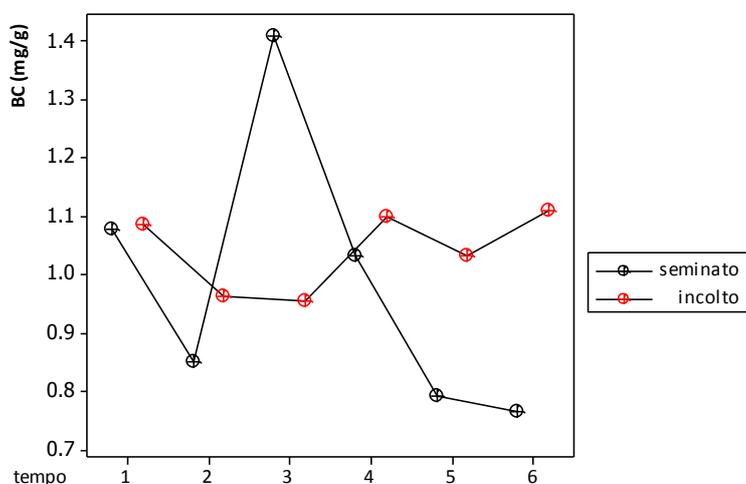



Figura 2.22 - Relazione tra la biomassa microbica (Bc) nelle due condizioni sperimentali (seminato – nero/ non seminato – rosso) ed il fattore tempo

2.3.5.6. Fitotossicità

Il test di fitotossicità è stato realizzato ad ogni campionamento, per complementare le informazioni sulla contaminazione da IPA, composti tendenzialmente idrofobi, ed avere un quadro sugli effetti e non solo sulle cause della contaminazione su organismi viventi. Nel caso di attenuazione della contaminazione si dovrebbe osservare un aumento della germinazione (IG%).

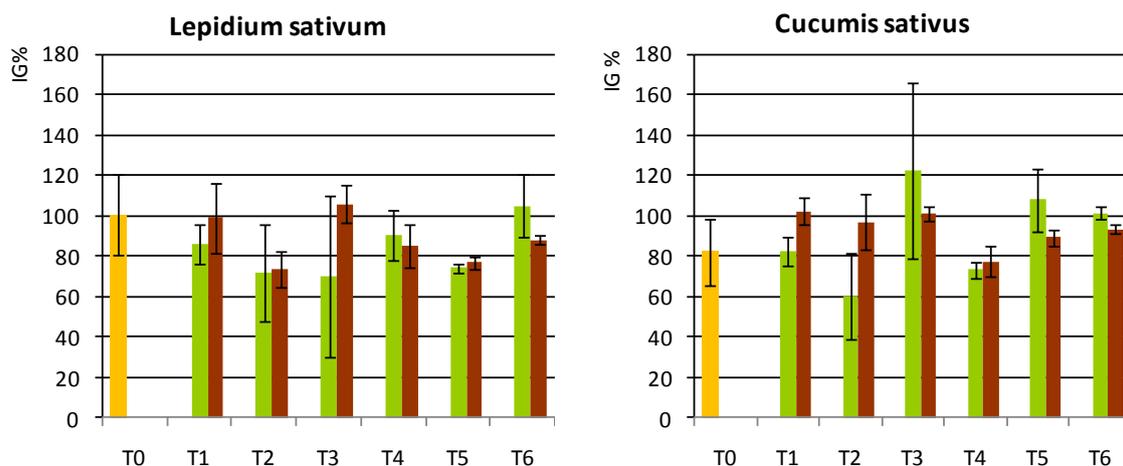



Figura 2.23 - Indice di germinazione percentuale (IG%) osservato nelle specie *L. sativum* e *C. sativus*. Vengono distinte le condizioni in cui è stato realizzato il test, suolo coltivato (verde) suolo incolto (marrone). È stato eseguito per i sei campionamenti e al tempo iniziale (T_0)

Tra le specie da seme impiegate per il saggio, è possibile affermare che il cetriolo (*Cucumis sativus*) risponde maggiormente rispetto al crescione (*Lepidium sativum*) nell'individuare punti critici per la tossicità nel suolo.

Dall'analisi statistica, confrontando le due condizioni sperimentali (seminato/non seminato) si nota che, nel suolo coltivato con *Medicago sativa* L., c'è significatività tra il tempo e l'indice di germinazione per il cetriolo; con l'avanzare del tempo si osserva una maggiore germinazione di questa specie (Rho = .489(*); Sig. (2 – code) .046; N = 17) facendo ipotizzare che vi siano in atto fenomeni di detossificazione del suolo.

Diversamente il crescione, non mostra alcuna correlazione e viene ritenuto meno sensibile alla tossicità esercitata dai campioni di suolo saggiati.

Considerando i dati bibliografici a nostra disposizione, ci si attendeva che *Medicago sativa* L. influisse sul suolo stimolando la degradazione e facendo verificare una riduzione sensibile della contaminazione dopo i sei mesi sperimentali. Ciò che è emerso da questa esperienza è che la realizzazione di studi di fattibilità in serra, si sono dimostrati molto complessi, sia sotto il profilo delle competenze che per effetti economici. Sarebbe necessario allestire un sistema di osservazione dei parametri ad un livello superiore, che tenga conto di molti più fattori rispetto a quello considerati, e ci sarebbe necessità di unire competenze nei diversi ambiti

per instaurare un sistema multidisciplinare. Le condizioni di coltivazione non si sono dimostrate sufficientemente idonee allo sviluppo di *Medicago sativa* L.
Sarebbe stato opportuno dotare la struttura ospitante le piante di un sistema di filtraggio dell'aria, o di un deposimetro che raccogliesse le deposizioni contenenti IPA, per valutare l'entità del trasferimento della contaminazione dal comparto atmosferico al suolo.
Possibili migliorie si potrebbero apportare al sistema di irrigazione, valutando la possibilità di realizzare un impianto a goccia piuttosto che l'impiego di un sistema a pioggia, più impattante sulle colture.

2.4. Bioaccumulo di IPA in Eisenia andrei

In considerazione delle informazioni tratte dalla letteratura sulla scarsa biodegradazione degli IPA pesanti a seguito della scarsa biodisponibilità (Johnsen, 2005) e dell'assenza di evidenze di degradazione nell'esperimento condotto in serra (cap. 2.3) su un terreno caratterizzato da una contaminazione da IPA "invecchiata", un'ulteriore sperimentazione è stata volta a valutare se gli IPA, che paiono scarsamente aggredibili dai microorganismi degradatori rizosferiali risultino biodisponibili per organismi che vivono a intimo contatto col suolo quali i lombrichi della specie *Eisenia andrei* in compresenza di *Medicago sativa* L.
L'ipotesi era volta a verificare se la contaminazione da IPA sia biodisponibile per queste specie edafiche e conseguentemente trasferibile ad altri organismi.
È stata scelto come bioindicatore *Eisenia andrei* in quanto la bibliografia mondiale riporta la particolare attitudine di questo organismo ad accumulare inquinanti, e, considerate le caratteristiche biologiche (rapporto con il suolo, sensibilità all'esposizione da contaminanti), rappresenta un ottimo indicatore per la nostra sperimentazione.
Il disporre di un suolo naturale con contaminazione invecchiata è un interessante aspetto dello studio, in quanto generalmente la bibliografia propone studi con suoli artificiali.

2.4.1. Eisenia andrei

Più dell'80% della totalità degli invertebrati negli ecosistemi terrestri è rappresentata dai lombrichi, che svolgono un importante ruolo nel suolo.

Vengono considerati buoni indicatori rispetto alla contaminazione del suolo, e costituiscono un "sistema precoce di allarme" per segnalarne possibili alterazione. Questo aspetto risulta interessante ai fini di effettuare una scrupolosa protezione degli ambienti naturali e della salute umana.

Eisenia andrei è comunemente utilizzata come specie standard nell'esecuzione di test di tossicità (OECD, 1984), ma anche nei test biologici per valutare la contaminazione del suolo (Fleuren, Jager, Roelofs, De Groot, Baerselman, & Peijnenburg, 2003).

L'efficacia dei lombrichi come bioindicatori è dovuta all'interazione che questi organismi hanno con grandi quantità di lettiera decomposta, letame e altri materiali organici decomposti presenti nel suolo; da tale interazione ne deriva la conversione in terriccio. Alcuni studi hanno dimostrato che la pelle dei lombrichi è in grado di captare i contaminanti, quindi questi organismi sono potenzialmente vantaggiosi nella valutazione del rischio ecologico (Yasmin & D'Souza, 2010).

Vi sono parametri dei suoli, come ad esempio il pH, il rapporto C/N, la capacità di scambio cationico, il contenuto di materia organica, il contenuto di argilla che hanno un effetto sulla sopravvivenza e vitalità dei lombrichi nei suoli. Questi parametri, i cui effetti non vanno confusi con gli effetti che le sostanze inquinanti hanno sui lombrichi, vanno tenuti in considerazione nella realizzazioni di test eco tossicologici (Amorin, Römbke, & Soares, 2005).

Il pH del suolo può influenzare la sopravvivenza degli adulti e le condizioni di produzione del novellame.

È stato osservato che lombrichi allevati in terreni con granulometria fine hanno un tasso di riproduzione inferiore rispetto ad individui allevati in terreni sabbiosi (Amorin, Römbke, & Soares, 2005).

Questo dato indica che la porosità del terreno influenza la mobilità dei lombrichi e gli scambi gassosi, fattore questo che, conseguentemente, influenza anche la loro sopravvivenza.

Un altro fattore molto importante è la temperatura, in quanto gli effetti di un contaminante possono variare enormemente al variare della stessa.
Ad esempio le temperature che si riscontrano ai tropici sembrano favorire la degradazione e la volatilizzazione delle sostanze chimiche presenti nel suolo. D'altro canto, condizioni di elevate temperature e umidità potrebbero aumentare la tossicità di alcuni pesticidi, rendendoli più velocemente assorbibili e penetrabili attraverso la pelle degli animali. Un obiettivo importante dell'ecotossicologia è quello di predire gli effetti delle sostanze chimiche dannose *in situ*, sulla base di esperimenti di laboratorio.
L'esposizione dei lombrichi ai contaminanti dipende molto dal grado di distribuzione che questi hanno sulla superficie del suolo, dal comportamento dei contaminanti stessi e dalla distribuzione verticale dei lombrichi nel terreno (Yasmin & D'Souza, 2010).
Il corpo dei vermi può venire considerato come un campionatore passivo. Il flusso dei contaminanti nel verme dipende da quanti contaminanti possono essere rilasciati nell'acqua interstiziale e quindi dal rapporto di porosità del suolo-acqua.
I lombrichi sono in grado di assorbire i contaminanti attraverso il contatto cutaneo e tramite ingestione diretta di terreno. È dimostrato che anche l'assorbimento dei composti gassosi è possibile. I contributi relativi alle diverse vie di assorbimento non sono ancora chiari, ma molti hanno dimostrato l'importanza del percorso di ingestione. Ad esempio Forber et al. mostra che l'assorbimento di fenantrene da parte di policheti marini dal sedimento sia 20–30 volte superiore rispetto al contributo dermico per contatto con l'acqua interstiziale (Qi & Chen, 2010).

2.4.2. Allestimento della sperimentazione

È stato prelevato del terreno dal sito contaminato ex-OPP (TS) nel punto denominato S3, ubicato a sud dell'area.
Sono stati raccolti 47 kg di terreno, setacciati con un setaccio a maglia larga (1 cm).
Il terreno è stato trasportato in una delle serre presenti nell'Azienda Agraria "A. Servadei" dell'Università degli Studi di Udine, serra dotata di un impianto di riscaldamento automatico, di un sistema di illuminazione e di un impianto di irrigazione, fattori questi che hanno

consentito di poter avviare l’esperimento durante il periodo invernale. Il terreno, così giunto, è stato ri-setacciato con un setaccio a maglia 5 mm, in modo tale da privarlo della frazione più grossolana; il suo peso a fine vagliatura è risultato essere di 40 kg.

Sono stati aggiunti, e opportunamente omogenizzati con il suolo, 800 g di ammendante organico commerciale “Optimus–Super 7.7.7.” (sementi Dotto) come fonte di nutrimento per i lombrichi.

A seguito di analisi con GC-MS, dopo estrazione con ASE, è stata verificata l’assenza di IPA nell’ammendante.

2.4.2.1. Preparazione dei vasi

Sono stati preparati in totale 24 vasi.

Al fine di evitare la dispersione dei vermi è stato posto alla base del vaso un doppio sistema di reti a maglia molto fine, utilizzando della rete da zanzariera. Il primo strato ricopriva il fondo del vaso, mentre lo strato sovrastante aveva dimensioni lievemente superiori al fine di avvolgerne le pareti ed aumentare ulteriormente l’azione protettiva.

In ogni vaso è stato posto un quantitativo di terreno pari a 1.5 kg facendo attenzione, durante l’operazione di riempimento, ad evitare la formazione di pieghe nella rete sul fondo, le quali potevano rappresentare delle vie di fuga per i lombrichi.

2.4.2.2. Condizioni sperimentali

Le condizioni sperimentali sulle quali poi sono state effettuate le analisi sono state distinte in:

- suolo contaminato seminato con *Medicago sativa* L. con presenza di lombrichi (M–L);
- suolo contaminato seminato con *Medicago sativa* L. senza lombrichi (M–NL);
- suolo contaminato incolto con presenza di lombrichi (NS–L);
- suolo contaminato incolto senza lombrichi (NS–NL);
- lombrichi allevati in suolo con piante (L–M);
- lombrichi allevati in suolo senza piante (L–NS).

Nei vasi seminati (M-L / M-NL) è stato posto un quantitativo pari a 1.5 g di semi. Secondo un principio cautelativo, ossia per assicurare un numero idoneo di piante per la sperimentazione, sono stati utilizzati molti più semi di *Medicago sativa* L., rispetto al quantitativo indicato nei manuali agronomici. Prima della messa a dimora dei lombrichi si è atteso un mese, di modo che *Medicago sativa* L. fosse sufficientemente sviluppata.

Le condizioni meteorologiche esterne al momento della semina non erano ottimali. Le precipitazioni si sono protratte per tutto il mese di novembre, con abbassamenti delle temperature che riportavano valori medi delle minime attorno ai 5°C. Le temperature interne della serra erano stabili attorno ai 12°C.

Figura 2.24 - Vasi ospitanti *Eisenia andrei*

Dopo 15 giorni dalla messa a dimora della pianta, si notava sulla superficie del suolo presenza di muffa e la germinazione dei semi era rada.

Al fine di indurre la germinazione ed abbassare il tasso di umidità che generava il proliferare di muffe, i vasi sono stati posti in due file parallele e sottoposti a luce artificiale, inducendo un ciclo diurno di 13 ore. È stato impostato un timer che garantiva l'accensione delle lampade (PowerStar HQI-E/P 400 W/D) dalle ore 17 alle 20 e la temperatura è stata impostata a 20°C.

Dopo 25 giorni, i vasi seminati a medica si presentavano inverditi, con una buona germinazione complessiva dei semi.

2.4.2.3. Messa a dimora dei lombrichi

I lombrichi sono stati messi a dimora dopo un mese dalla semina di *Medicago sativa* L. Sono stati acquistati in un allevamento certificato, Lombricoltura Compagnoni, con sede a Lecco.

Considerata l'attitudine dei vermi alla fuga, i vasi sono stati avvolti da un materiale plastico di altezza 32.5 cm. Per lo stesso motivo è stata messa una rete esterna al vaso e fissata con un adesivo plastico ad alta tenuta.

Sono stati selezionati per la prova sperimentale gli individui che manifestavano maggiore mobilità. Sono stati pesati 20 g di lombrichi da porre in ogni vaso, equivalenti a circa 35 esemplari di medie dimensioni. I lombrichi sono stati scelti e contati nel laboratorio del Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Trieste, posti in un contenitore di alluminio e trasportati nella serra sperimentale dell'Università di Udine.

Giunti alla serra sperimentale (UD), i lombrichi sono stati puliti dal substrato (terreno di coltura) nel quale viaggiavano, nuovamente pesati e messi a dimora nei vasi.

Per agevolare la penetrazione dei lombrichi, soggetti molto sensibili agli ambienti umidi, nel suolo, è stata somministrata una quantità di acqua pari a 200 ml, posta nel sottovaso ed una minima quantità in superficie.

Dopo pochi minuti i lombrichi si sono introdotti nel sottosuolo, sia nei vasi seminati che in quelli in assenza di piante.

Si è deciso di interrompere la sperimentazione dopo otto settimane dalla messa a dimora dei lombrichi. Il tempo è stato ritenuto sufficiente per poter osservare fenomeni di bioaccumulo sulla base della consultazione di dati di letteratura considerati ed in considerazione delle esigenze di crescita di *Medicago sativa* L. Per questa sperimentazione ci si è avvalsi della collaborazione dell'Unità di Ricerca della Prof.ssa Maria De Nobili, operante nel Dipartimento di Scienze Agrarie ed Ambientali dell'Università degli Studi di Udine.

2.4.2.4. Piano di analisi

Al termine della sperimentazione sono state eseguite le seguenti analisi:

- Determinazione degli IPA nei lombrichi a dimora in suolo coltivato e non coltivato (L-M; L-NS);
- Determinazione degli IPA nel suolo per la condizione coltivato e incolto (NS-L; NS-NL; M-L; M-NL).

Inoltre sono stati registrati i parametri biometrici di *Medicago sativa* L. e *Eisenia andrei*.

2.4.3. Risultati

La finalità di questo studio è stata valutare il trasferimento dei contaminanti agli organismi viventi impiegando un animale facilmente allevabile e reperibile commercialmente che tipicamente si nutre ingerendo il suolo: il lombrico.

I risultati che seguono mostrano dati interessanti che hanno permesso di fare alcune considerazioni in merito alle attuali misure di sicurezza imposte dal D.Lgs. 152/2006 a tutela della salute pubblica e dell'ambiente.

Al termine della sperimentazione i campioni di *Eisenia andrei* sono stati pesati, in seguito posti in stufa a 40°C per 48 ore ed infine ne è stato registrato il peso dopo la disidratazione.

Nella tabella che segue vengono riportati il peso fresco e secco (g) dei lombrichi e la perdita percentuale di peso che rappresenta la perdita di acqua per ogni campione. I lombrichi, che presentano un contenuto medio di acqua dell'83%, sono stati trattati come descritto in appendice A.4.5 le soluzioni risultati sono state sottoposte ad analisi mediante spettrometria GC–MS per la ricerca della presenza ed eventuale quantificazione degli IPA.

Tabella 2.9 - Campioni di *Eisenia andrei* differenziati secondo le condizioni: (L–M) esposti a suolo con *Medicago sativa* L.; (L–NS) esposti a suolo incolto; (T_0) *E. andrei* al tempo iniziale

SIGLA CAMPIONE	PESO FRESCO (g)	PESO SECCO (g)	VARIAZIONE % ((Vf – Vi)/Vi)*100
T0	20.48	3.48	83.1
L1–M	9.13	1.29	85.9
L2–M	6.98	1.35	80.7
L3–M	7.58	1.61	78.8
L1–NS	9.48	1.39	85.4
L2–NS	7.54	1.21	83.9
L3–NS	9.87	1.51	84.7

Di seguito viene riportata la tabella dei campioni di terreni impiegati per la sperimentazione.

Tabella 2.10 - Campioni di suolo differenziati secondo le condizioni: suolo coltivato a *Medicago sativa* L. con presenza di *E. andrei* (M–L); suolo coltivato a medica in assenza di *E. andrei* (L–NS); suolo incolto con presenza di *E. andrei*; suolo al tempo iniziale (T_0)

SIGLA CAMPIONE	PESO FRESCO (g)	PESO SECCO (g)	VARIAZIONE % ((Vf – Vi)/Vi)*100
T0	14.85	7.74	47.88
M1–L	4.85	4.09	15.6
M2–L	8.88	1.55	82.5
M3–L	6.67	1.24	81.4
M1–NL	9.17	8.00	12.7
M2–NL	7.37	6.4	13.1
M3–NL	8.63	7.18	16.8
NS1–L	10.27	3.64	64.6
NS2–L	8.04	7.01	12.8
NS3–L	5.27	2.27	57

Per ogni IPA monitorato è stato ottenuto dallo strumento il rapporto segnale / rumore da cui sono stati calcolati il limite di rilevabilità – *Limit of detection* (LOD) e il limite di quantificazione - *Limit of quantification* (LOQ). Nella Tabella 2.11 vengono riportati i valori dei LOD e LOQ per i rispettivi composti.

Tabella 2.11 - Limiti di quantificazione per gli idrocarburi policiclici aromatici espressi in µg/kg

	LOD	LOQ
Pirene	1.96	6.54
Benzo[a]antracene	20.04	66.82
Crisene	14.75	49.18
Benzo[b+k]fluorantene	128.30	229.01
Benzo[a]pirene	35.43	118.11
Indeno[1,2,3-cd]pirene	85.71	285.71
Dibenzo[ah]antracene	133.33	444.44
Benzo[ghi]perilene	33.40	111.32

Prima di procedere alla discussione dei risultati delle analisi, si riportano i valori di contaminazione del suolo in cui sono stati messi a dimora i lombrichi.

Il suolo della sperimentazione presentava i seguenti livelli di concentrazione per gli otto IPA monitorati:

Tabella 2.12 - Concentrazione degli IPA nel punto S3 posto nel sito ex-OPP, determinato per gli esperimenti di bioaccumulo su *Eisenia andrei*

	Limite ex. D.Lgs. 152/06 Limite 1-A (mg/kg ss)	**S3** (mg/kg ss)	**Superamenti limite Tabella 1-A**
Pirene	5	3.97	0.794
Crisene	5	1.61	0.322
Benzo[a]antracene	0.5	1.83	3.66
Benzo[b+k]fluorantene	0.5	3.43	6.86
Benzo[a]pirene	0.1	1.61	16.1
Indeno[1,2,3-cd]pirene	0.1	1.50	15
Dibenzo[a,h]antracene	0.1	0.50	5
Benzo[g,h,i]perilene	0.1	1.48	14.8

Inoltre è stato determinato il pH che riporta un valore di 7.8 e la capacità di scambio cationico che è di 21.4 cmoli/kg (fornito dal Gruppo di Ricerca della Prof.ssa De Nobili).

Si riporta il grafico dove viene illustrato il risultato dell'analisi su *Eisenia andrei* esposta a terreno coltivato con *Medicago sativa* L. e suolo incolto Figura 2.25.

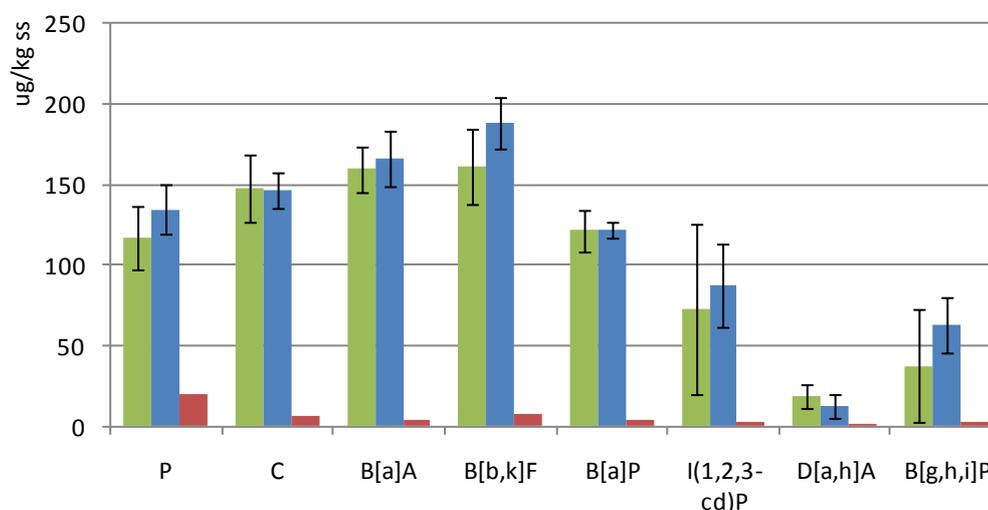



Figura 2.25 - Bioaccumulo di IPA in *Eisenia andrei* esposta a suolo contaminato coltivato (verde) con *Medicago sativa* L. e suolo contaminato incolto (blu), la barra rossa corrisponde ad *Eisenia andrei* al T_0, prima dell'esposizione al suolo

Come si osserva dalla Figura 2.25 non si nota una significativa differenza tra l'accumulo nei lombrichi posti in terreno contaminato seminato e non seminato (t–Student ($p < 0.05$), $t = 0.3762$; $N = 14$; $p = 0.7124$). La figura riporta valori numerici, determinati strumentalmente

senza considerare i parametri di affidabilità analitica (limiti di quantificazione - LOQ) riportati in Tabella 2.11. Tenendo in considerazione i LOQ, si può commentare che:

- per quanto riguarda i lombrichi al tempo iniziale (T_0) tutti gli IPA monitorati mostrano valori inferiori al LOD tranne il Pirene che invece risulta qualificabile e quantificabile;
- per quanto riguarda i lombrichi al tempo finale (sia in presenza di medica che non) tutti gli IPA monitorati sono quantificabili tranne il Benzo[b+k]fluorantene e Benzo[g,h,i]perilene che risultano qualificabili poiché superiori al LOD ma inferiori al LOQ e Indeno[1,2,3-cd]pirene e Dibenzo[a,h]antracene che mostrano valori inferiori al LOD.

Dal confronto tra i lombrichi al tempo finali con i lombrichi al tempo iniziale, si evince che:

- la concentrazione di Pirene aumenta di più del 400%;
- Crisene, Benzo[a]antracene e Benzo[a]pirene non sono presenti al T_0 e sono invece presenti in quantità significativa al tempo finale;
- il Benzo[b+k]fluorantene e Benzo[g,h,i]perilene risultano assenti al tempo iniziale e presenti ma non quantificabili al tempo finale;
- non si osserva accumulo di Indeno[1,2,3-cd]pirene e di Dibenzo[a,h]antracene che riportano valori inferiori al LOD sia al tempo iniziale che alla fine.

Gli IPA monitorati sono caratterizzati dall'avere un peso molecolare elevato, sono costituiti da 4–6 anelli benzenici. Sebbene le loro caratteristiche chimico–fisiche li rendano poco disponibili, e quindi tendano a rimaner adesi alla matrice suolo, come dimostrato i lombrichi sono in grado di assumere anche questi composti organici dal suolo attraverso il contatto dermico e per ingestione. E' da sottolineare che l'esperimento è stata condotto utilizzando una matrice complessa ossia un suolo contaminato realmente, e non come comunemente riportato in bibliografia con contaminazione artificiale.

È stata presa in considerazione anche l'ipotesi che la presenza di piante potesse influire sulla biodisponibilità dei contaminanti. Dall'elaborazione dei dati ottenuti, si osserva che la

presenza di piante non influenza la disponibilità degli IPA nel suolo, non si notano differenze significative ($p < 0.05$) se si confrontano i dati ottenuti dalle analisi di *E. andrei* in suolo coltivato e suolo incolto (t–Student, $t = 0.3762$, $N = 14$, $p = 0.7124$)

Anche se confrontiamo il livello degli IPA riscontrati nel suolo coltivato con *Medicago sativa* L. e la presenza assenza di *Eisenia andrei*, non si verificano differenze significative ($p < 0.05$) (t–Test, $t = 0.5047$; $N = 14$; $p = 0.6216$) tra le due condizioni, come non si riscontra significatività tra il suolo coltivato con medica ed il terreno proveniente dal sito S3 (t–Test, $t = 0.1715$; $N = 14$; $p = 0.8663$).

Due mesi di sperimentazione non sono stati sufficienti per apprezzare l'influenza di medica sulla contaminazione del suolo.

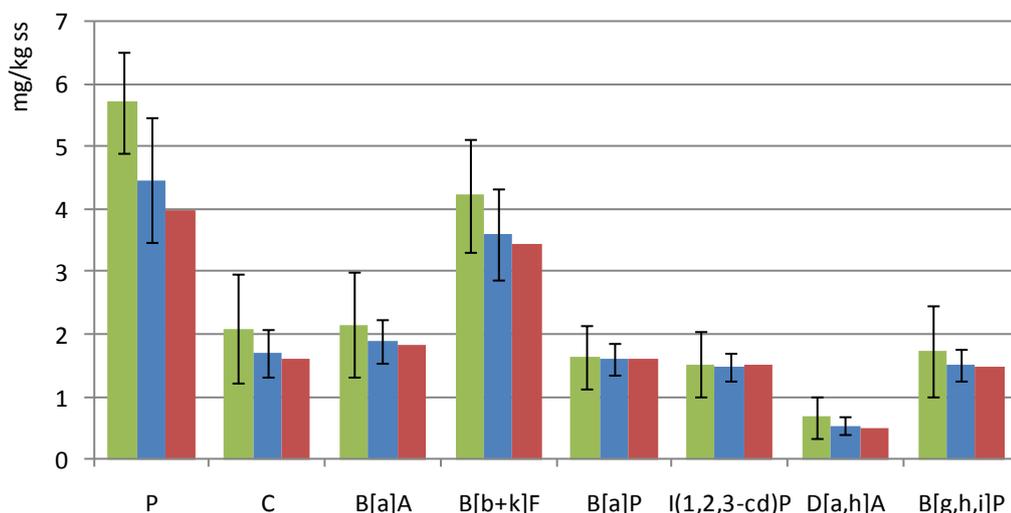



Figura 2.26 - Distinzione tra suolo coltivato con *Medicago sativa* L. e presenza/assenza di *Eisenia andrei* (verde = suolo con medica con *Eisenia*, blu = suolo con medica senza *Eisenia*, marrone = suolo S3)

Il grafico che segue mostra la distinzione tra suolo incolto con presenza di lombrichi e suolo senza lombrichi. Anche in questo caso non si osservano variazioni significative tra le due condizioni ($p < 0.05$) (t–Test, $t = 0.4195$, $N = 14$; $p = 0.6812$)

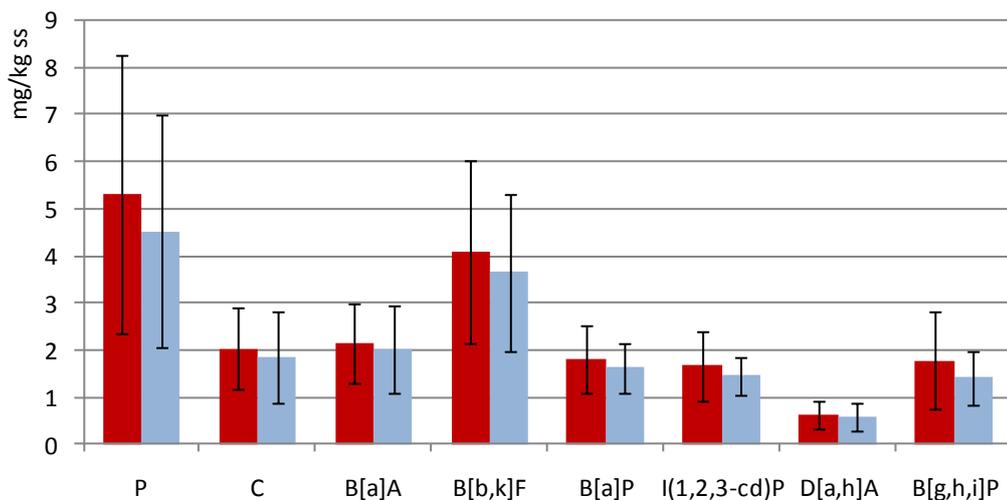



Figura 2.27 - Distinzione tra suolo incolto con presenza (rosso) e assenza (blue) di *Eisenia andrei*

Per una valutazione maggiormente dettagliata sarebbe necessario valutare in modo approfondito la ripartizione dei contaminanti nella frazione porosa del suolo e valutare quanto il contaminante sia in grado di solubilizzarsi nell'acqua interstiziale. Queste considerazioni sono tutte dirette verso una maggiore conoscenza per la valutazione del rischio ecologico da parte di sostanze xenobiotiche, e degli IPA in particolare.

Dall'osservazione dei dati emerge che *Eisenia andrei* è in grado di accumulare significativi livelli di contaminati, anche se, come nel presente caso, presentino una struttura articolata ed un alto peso molecolare. Tra IPA monitorati, abbiamo osservato che il Benzo[a]pirene, che come già descritto è stato riconosciuto dall'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) come cancerogeno per l'uomo con effetti dimostrati (IARC, 1983), viene bioaccumulato in *E. andrei* raggiungendo valori sopra il limite dato dalla Tab.1, colonna A, allegato 5, Parte IV, Titolo V del D.Lgs. 152/2006.

A seguito di queste evidenze si discute sull'efficacia del D.Lgs. 152/2006 in materia di messa in sicurezza. L'Art. 240 Parte IV, Titolo V del D.Lgs. 152/2006 si definisce (n):

Messa in sicurezza operativa:

l'insieme di interventi eseguiti in un sito con attività in esercizio atti a garantire un adeguato livello di sicurezza per le persone e per l'ambiente, in attesa di ulteriori interventi di messa in sicurezza permanente o bonifica da realizzarsi alla cessione

dell'attività. Essi comprendono altresì gli interventi di contenimento della contaminazione da mettere in atto in via transitoria fino all'esecuzione della bonifica o della messa in sicurezza permanente, al fine di evitare la diffusione della contaminazione all'interno della stessa matrice o tra matrici differenti. In tali casi devono essere predisposti piani di monitoraggio e controllo che consentano di verificare l'efficacia delle soluzioni adottate.

Il sito contaminato ex–OPP è stato definito tale in base al D.M. 471/99, oggi abrogato, che dava la seguente definizione di *Misure di sicurezza*:

specifici interventi e controlli necessari per impedire danni alla salute pubblica o all'ambiente derivanti dai livelli di concentrazione residui di inquinanti nel suolo, sottosuolo, nelle acque sotterranee e superficiali [...].

Pare che la normativa non tenga conto della possibilità di trasferimento dei contaminazione alla catena trofica, come invece l'evidenza dei risultati mostra. In aree con presenza della specie *E. andrei* è molto probabile che essa possa rientrare nella dieta di taxa che usualmente si alimentano di Lumbricidi come diversi mammiferi Carnivori, Roditori, Soricomorfi, Erinaceomorfi (Amori, Contoli, & Nappi, 2008) (Toschi, 1965) (Boitani, Lovari, & Vigna Taglianti, 2003), di alcuni Rettili (Arnold & Ovenden, 2003), di Anfibi (Lanza, 2007) (Dolce & Stoch, 1984) e di Uccelli, pertanto è plausibile un rischio di trasmissione dei contaminanti a livelli superiori della catena trofica.

Si evidenzia pertanto una pressione associata, alla presenza di inquinanti, sugli organismi animali dell'ecosistema del parco "ex-OPP", la cui significatività rimane da valutare compiutamente.

Conclusioni

Il lavoro di Dottorato ha affrontato il tema della valutazione dell'efficacia dell'approccio della rizodegradazione, sostenibile dal punto di vista economico e degli impatti sul territorio e sull'ambiente, per la bonifica di suoli soggetti ad una contaminazione da Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA). Si è anche voluto valutare la biodisponibilità di questi contaminanti, nel caso di un inquinamento "invecchiato", per capire se questi composti, poco solubili e relativamente poco volatili, possano essere mobilizzati. Questo contributo si inserisce nelle azioni mirate a proporre soluzioni ad una condizione complessa di contaminazione su di un'area di interesse pubblico, ubicata in Provincia di Trieste, il Parco di San Giovanni, noto anche come "ex OPP"

Sono state redatte le linee guida per la realizzazione di un impianto di fitorimedio testandone l'efficacia in due contesti distinti, in pieno campo e in una serra sperimentale. Le specie impiegate per lo studio sono state *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L. La biodisponibilità ed il trasferimento dei contaminanti organici al biota è stata verificata impiegando una specie che vive a stretto contatto con il suolo, *Eisenia andrei*, appartenente alla Famiglia dei Lumbricidae.

I risultati sinora acquisiti appaiono incoraggianti, ed in particolare i dati ottenuti dalla sperimentazione in pieno campo, effettuata in condizioni di contaminazione moderata, riportano riduzioni significative (dall'80 al 100%), e il rientro in condizioni inferiori alle Concentrazioni Soglia di Contaminazione. La sperimentazione in serra, effettuata considerando una contaminazione più elevata, ha evidenziato alcuni limiti non mostrando una mitigazione dell'inquinamento. È emersa la necessità di un miglior controllo di possibili contributi esterni alla contaminazione come ad esempio le deposizioni su suolo e piante di IPA aerodispersi. La valutazione ed il controllo di tutti i fattori che influiscono sul sistema suolo-pianta-contaminanti, durante sperimentazioni che si protraggono per mesi, risultano articolati anche in condizioni semplificate quali quelle di una serra sperimentale, richiedendo sforzi e risorse. La capacità di intercettare contaminanti aerodispersi da parte degli apparati fogliari, in particolare in prossimità di direttrici di traffico, e la valutazione del *leaching* da

essi, ha aperto una nuova direttrice di ricerca nell'ambito delle fitotecnologie, volta all'ottimizzazione di "barriere verdi" per particolato atmosferico ed IPA.

L'ipotesi di scarsa mobilità attribuita a contaminazioni invecchiate di IPA pesanti, è stata confutata, nel caso considerato, dal test di bioaccumulo con *Eisenia andrei*.

Disporre di dati sul contenuto totale della contaminazione di un suolo non è sufficiente per valutare il rischio ecologico che queste sostanze possono comportare. La disponibilità di una sostanza dipende dalle condizioni chimico-fisiche del terreno (es. pH, contenuto di argilla, capacità di scambio cationica, quantità di materia organica) e dalle caratteristiche del composto. Per valutare l'effettivo stato di contaminazione di un suolo in relazione alla sua potenziale pericolosità per gli esseri viventi, devono essere utilizzati dei test biologici che permettono di valutare l'effettiva tossicità dei contaminanti (Loureiro, Soares, & Nogueira, 2005).

Al fine di stabilire limiti ragionevoli sulla contaminazione dei suoli, per definire parametri di legge o per rispondere ad una pianificazione lungimirante del territorio, è necessario comprendere appieno tutti i processi che portano al sequestro o al rilascio dei contaminanti (EPA, 2004).

Il fitorimedio appare una promettente tecnologia per dare risposta a stati alterati dell'ambiente. Si è constatato che l'approccio alla risoluzione dei problemi in campo ambientale deve esser considerato come un approccio multidisciplinare, dove diverse competenze (biologiche, chimiche, agronomiche, gestionali, etc.) scelgono di compartecipare ai fini di una progettazione il più esaustiva possibile, e di portare a soluzione i processi di mitigazione della contaminazione e di rinaturalizzazione. In particolare per quel che riguarda interventi sul sito di San Giovanni "ex-OPP" si ritiene utile implementare lo studio iniziato con degli approfondimenti rispetto al territorio: appare necessaria una elaborazione floristica del sito, la quale potrebbe far emergere o comprendere le modalità di soluzione del problema, identificando specie già note in letteratura per le loro capacità nella fitobonifica.

In questo contesto appare necessaria un'interlocuzione con legislatori in campo ambientale, e amministratori pubblici ai fini di identificare percorsi istituzionali per poter promuovere tecniche di bonifica e messa in sicurezza sostenibili come quelle proposte dal fitorimedio.

Appendice A. Materiali e metodi

Il presente capitolo riporta le metodiche ed i materiali impiegati per la realizzazione delle analisi citate nei capitoli precedenti.

Notevole è stato lo scambio di conoscenza multidisciplinare per migliorare la comprensione dei risultati ottenuti.

A.1. Campionamento del suolo

Il campionamento del suolo è avvenuto in due contesti distinti, *in situ* ed in serra.

Per la raccolta del materiale *in situ* ci si è avvalsi di un carotatore manuale in acciaio inox; la profondità raggiunta dallo strumento è stata di 20 cm.

I campioni prelevati nei mesocosmi ospitanti *Medicago sativa* L. e *Vetiveria zizanioides* L. sono stati raccolti in modo casuale sia sulla superficie coltivata che su quella incolta.

Così distinti, sono stati posti su di un telo di plastica atto alla miscelazione del terreno, in modo da rendere omogeneo il campione. Una volta miscelato, il terreno è stato posto in sacchetti di plastica (ca 500 g) opportunamente etichettati e trasportati nel laboratorio del Dipartimento di Scienze Chimiche. Qui è stato sottoposto alla setacciatura (con setaccio a maglia 2 mm) e conservato in congelatore in attesa delle analisi.

I risultati analitici di ciascun campione vanno considerati come valori medi di ciascuna condizione sperimentale.

La scelta di tale metodo di raccolta è da ricondursi alle seguenti considerazioni:

- riduzione dei costi, in quanto il numero delle analisi così effettuate si riduce;
- diminuzione dei tempi;
- rappresentatività maggiore dell'area di studio rispetto alla scelta di campionare in un singolo punto.

D’altro canto questo approccio presenta degli svantaggi:

- il risultato dell’analisi è un valore medio del lotto. Non è possibile stimare la variabilità del dato all'interno dell’area campionata;
- non è possibile individuare *outlier* essendo il campione il risultato di un’omogeneizzazione di più prelievi.

Il campionamento in serra è consistito nella raccolta di suolo e vegetali. Ad ogni campionamento si è provveduto a trattare tre vasi per ogni condizione sperimentale, in modo del tutto indipendente.

In presenza di piante si è provveduto all’attenta separazione delle due matrici.

Il terreno è stato prelevato, setacciato (a 2mm) e anche in questo caso posto in sacchetti di plastica opportunamente etichettati in attesa delle analisi.

I vegetali sono stati attentamente privati dai residui di suolo, pesati e lavati, dopo aver annotato i dati biometrici.

Sia il terreno che i vegetali sono stati essiccati in stufa ad una temperatura di 40°C per 48 e poi conservati in congelatore a–20°C.

A.2. Caratterizzazione chimico – fisica del suolo

La conoscenza delle caratteristiche chimico–fisiche di un sito contaminato consente di poter effettuare delle scelte rispetto alla pratica di bonifica da applicare al sito stesso.

Vi sono alcuni fattori che influenzano in modo determinante l’esito del processo.

Per l’applicazione del fitorimedio, le condizioni del suolo devono essere idonee allo sviluppo delle specie vegetali. In alcuni casi si può intervenire sulle caratteristiche chimico–fisiche di un terreno (ad es. con l’impiego di ammendanti, correttivi di pH o trattamenti speciali) creando le condizioni più adeguate.

La caratterizzazione chimico–fisica del suolo è stata svolta principalmente durante il primo anno di Dottorato, su campioni di terreno della sperimentazione *in situ*.

A.2.1. Determinazione del grado di reazione – pH

Il pH è stato determinato per via potenziometrica all'inizio della sperimentazione su campioni prelevati nel punto denominato OPP5.

Dopo aver tarato il pH–metro con una soluzione tampone di riferimento avente pH simile a quello del campione, si trasferiscono 10 g del campione di suolo in un becker da 50 ml al quale si aggiungono 25 ml di acqua ottenuta con un sistema integrale di purificazione (milli–Q) (rapporto in peso 1 : 2.5). Si lascia agitare la soluzione per un paio di ore. La misura viene fatta dopo che le sospensioni si depositano sul fondo del contenitore.

I valori ottenuti sono indicativi del grado di reazione del sistema suolo (Violante, 2000).

A.2.2. Capacità di scambio cationica (CSC)

Per la determinazione della capacità di scambio cationica sono stati impiegati bario cloruro ($BaCl_2$) e trietanolammina ($[N(CH_2CH_2OH)_3]$). Il terreno è stato monosaturato con una soluzione di bario cloruro ($BaCl_2$) a pH 7.8. Al campione così saturato viene aggiunta una quantità a titolo noto di magnesio solfato ($MgSO_4$). Dalla reazione conseguente si forma bario solfato ($BaSO_4$) insolubile. Calcolando la quantità di magnesio adsorbito (corrispondente al bario scambiato) si determina la capacità di scambio cationico (Violante, 2000).

A.2.3. Determinazione della granulometria

L'utilizzo del granulometro laser Malvern 2000 ha consentito di determinare la granulometria dei campioni di suolo. Tale strumento consente di osservare dimensioni comprese tra 0.02–2000 µm. Utilizza il principio della tecnica di Laser Diffraction (LD) secondo il quale la luce che investe una particella in sospensione viene diffratta di un certo angolo, il quale dipende dalle dimensioni della particella stessa. L'angolo di diffrazione è inversamente proporzionale alla dimensione della particella e l'intensità del raggio diffratto con un dato angolo è una misura del numero di particelle aventi una determinata area della

sezione trasversale presenti lungo la traiettoria del raggio (Bagarello, Di Stefano, Ferro, Iovino, & Mirabile, 2009).
Il granulometro laser Malvern è stato messo a disposizione dal Dipartimento di Geoscienze dell'Università di Trieste.

A.2.4. Determinazione del contenuto di umidità

Il calcolo dell'umidità del suolo ha diversi significati. Può avere importanza per verificare la disponibilità d'acqua nella porzione di terreno interessata dagli apparati radicali o per calcolare, come vedremo in seguito, altri parametri.
Viene calcolata per differenza di massa tra un campione di terreno fresco e lo stesso campione essiccato a 105°C per almeno due ore, fino a raggiungere una massa costante (Violante, 2000).

$$U = 100 * \frac{m_0 - m_1}{m_0}$$

U = umidità espressa in percentuale;
m_0 = massa del campione (g) prima dell'essiccazione;
m_1 = massa del campione (g) dopo l'essiccazione in stufa.

A.2.5. Determinazione della capacità di ritenzione idrica (Water Holding Capacity)

Per calcolare la WHC, si pone una quantità nota di terreno in un imbuto, sopra il quale poggia un filtro di carta. Si versa un volume noto di acqua distillata sul terreno e dopo alcune ore si annota il volume d'acqua percolata.

La WHC è espressa dalla formula che segue:

$$WHC = (H_2O_{agg} - H_2O_{perc}) + U$$

H_2O_{agg} = volume d'acqua distillata aggiunta al campione

H_2O_{perc} = volume d'acqua percolata

U = umidità del terreno (calcolata precedentemente come indicato nell'Appendice A.2.4

A.2.6. Determinazione del carbonio organico e dell'azoto con analizzatore elementare

Il procedimento seguito per la determinazione del carbonio e azoto totale si basa sul metodo Dumas (Dumas, 1831).

Tale metodo si fonda sulla completa ed istantanea ossidazione del campione per *flash combustion* (Violante, 2000) con conseguente conversione di tutte le sostanze organiche ed inorganiche in prodotti gassosi. I gas di combustione vengono fatti passare, spinti da corrente di elio, su uno strato di un opportuno catalizzatore, ai fini di completare il processo di ossidazione. Successivamente i gas vengono convogliati su strato di rame, per allontanare l'eccesso di ossigeno e per ridurre gli ossidi di azoto ad azoto molecolare (N_2). La miscela gassosa così trattata viene separata per gascromatografia e CO_2, N_2, H_2O e SO_2 vengono rilevati da un detector a conducibilità termica (Figura 2.28).

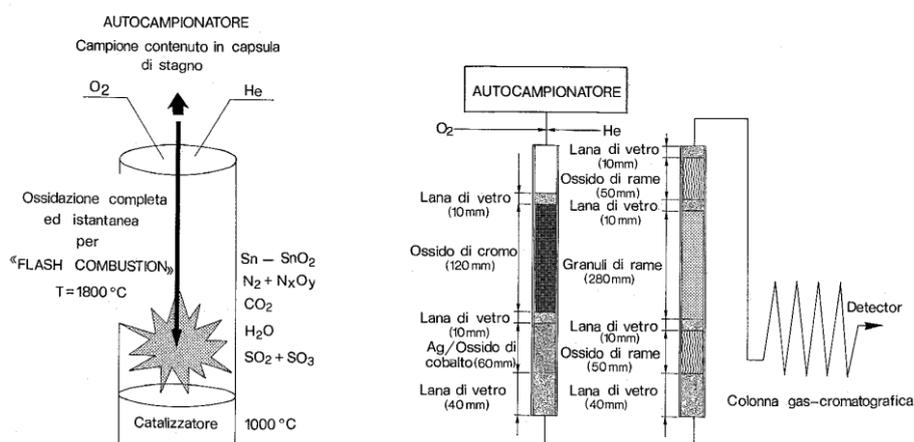



Figura 2.28 - Schematizzazione di un analizzatore elementare

Per la preparazione del campione, si pone del terreno in stufa a 80°C per 24 ore, lo si setaccia a 0.5 mm ed in seguito lo si polverizza con un mortaio di ambra.

Si pesano in una capsula di argento 15–20 mg di campione e si pone la capsula su di un supporto di alluminio. Il calcio carbonato presente nel campione viene rimosso prima dell'analisi mediante trattamento con HCl (10%), al fine di determinare il carbonio organico in assenza di interferenze.

Si lascia riposare il campione per una notte su una piastra riscaldante. Dopo una fase di raffreddamento si chiude la capsula di argento e la si sistema sull'autocampionatore dell'analizzatore elementare.

Va detto che i metodi per la determinazione del carbonio organico totale non fanno distinzione tra le fonti (Schumacher, 2002).

A.2.7. Valutazione del contenuto di sostanza organica

La determinazione della sostanza organica è un fattore essenziale nella caratterizzazione di un sito, per valutare come i composti chimici reagiscono nel suolo. Il suo valore è stato determinato per via indiretta: sulla base del contenuto di carbonio organico, si ottiene il valore della sostanza organica utilizzando il "fattore di Van Bemmelen" pari a 1000/580 = 1.724, che si fonda sull'assunto che il carbonio rappresenta mediamente il 58% ossia 580 g/Kg della composizione elementare della sostanza organica del suolo (Jackson, 1964).

A.3. Analisi microbiche del suolo

Visto il ruolo fondamentale delle componente microbica nel suolo e il contributo che questa fornisce per la degradazione dei contaminanti organici, si è voluto effettuare delle osservazioni quantitative in merito.

I campioni che sono stati sottoposti a queste analisi sono quelli derivati sia dalla sperimentazione in campo (ottobre, 2008), che in serra (2009).

A.3.1. Determinazione della biomassa microbica

Vista l'estrema vulnerabilità di questa componente, il terreno per la determinazione della biomassa microbica *in situ* è stato campionato ad ottobre, mese in cui le condizioni di umidità e temperatura del suolo sono piuttosto stabili (le variazioni di questi due parametri sono contenute) e quindi favorevoli allo sviluppo della biomassa microbica.

I campioni di terreno provenienti dalla sperimentazione in serra sono stati trattati per la determinazione della biomassa microbica lo stesso giorno del campionamento.

Il carbonio della biomassa microbica (C_{mic}) è stato misurato con il metodo della fumigazione–estrazione (Alef & Nannipieri, 1995).

Il metodo si basa sul principio che i vapori del fumigante, in questo caso il cloroformio ($CHCl_3$), provocano la lisi, in seguito alla morte, delle cellule microbiche ed il conseguente rilascio del contenuto citoplasmatico.

Al fine di stabilizzare le comunità microbiche presenti nel suolo fresco, i campioni sono stati pre–incubati per una settimana in condizioni standard, al 50% della capacità di ritenzione idrica (WHC) a 25°C. Per far ciò si è dovuto prima procedere alla determinazione della WHC e del contenuto di umidità al momento del prelievo.

Al termine del suddetto periodo di acclimatamento, sono stati pesati 30 g di terreno per campione, aggiustati al 50% della WHC ed introdotti in un essiccatore. Alla base sono stati posti dei becker contenenti 50 ml di $CHCl_3$ e qualche pallina di vetro. Per garantire l'umidità è stato posto all'interno dell'essiccatore un becker con dell'acqua. Si è creato un ambiente saturo di $CHCl_3$ con l'impiego di una pompa del vuoto. Dopo che il $CHCl_3$ ha iniziato a bollire

si è lasciato funzionare la pompa ancora per qualche minuto, si è chiuso il sistema e quindi è seguita l'incubazione per 24 ore a una temperatura di 24°C. Passato il tempo necessario il $CHCl_3$ è stato completamente rimosso dall'essicatore con l'ausilio di una pompa a vuoto.

A ciascun campione è stata aggiunta una soluzione di K_2SO_4 0.5 mol/l con rapporto suolo: soluzione estraente di 1:4. I campioni così preparati sono stati posti in un agitatore meccanico per 30 minuti ed in seguito filtrati con filtri Whatman n° 42.

La procedura sopra descritta è stata rispettata anche per i campioni non fumigati, posti in essiccatore in assenza di $CHCl_3$.

Il contenuto della biomassa microbica presente nei campioni di suolo calcolata per differenza secondo la formula:

$$C_B = C_F - C_{NF}$$

C_B = carbonio della biomassa microbica
C_F = carbonio estratto da campione fumigato
C_{NF} = carbonio estratto da campione non fumigato

I due valori sono stati ottenuti utilizzando un analizzatore di carbonio organico totale (Total Organic Carbon Analyzer – TOC) della Shimadzu come differenza del carbonio organico disciolto (Dissolved Organic Carbon – DOC) nei campioni fumigati e il DOC nei campioni non fumigati.

Il risultato viene riportato al peso secco del campione ed è espresso in µg/g.

Figura 2.29 - Total Organic Carbon Analyzer

A.3.2. Quoziente microbico

Il carbonio organico totale e quello della biomassa microbica costituiscono fattori chiave nella valutazione della qualità del suolo e sono correlati nel quoziente microbico (rapporto tra C della biomassa microbica e C organico totale), considerato un indicatore dell'attività biologica e dell'accumulo di carbonio organico nel terreno (Elliot 1997).

$$C_B / TOC$$

C_B = carbonio derivante dai microrganismi del suolo (calcolato in appendice A.3.1)
TOC = carbonio organico totale

A.3.3. Rapporto C/N

Il rapporto carbonio/azoto è spesso considerato un indice per valutare il processo di decomposizione dei residui colturali. Il suo valore varia da 13 a 20 nei raccolti di legumi, 40 per le colture da mais, 80 per paglia e cereali. È stato dimostrato che può raggiungere valori fino a 500-800 per la segatura.
Considerata la composizione dei residui delle piante, risulta che parte del carbonio e azoto vengono spesi nei cicli di questi elementi. Una considerevole quantità di N e una parte di C viene liberata ed incorporata nelle cellule dei microrganismi, parte di questa quantità viene destinata alla formazione di *humus*. La maggior parte dei terreni ha un rapporto C/N che cade nel *range* che va da 10 a 15, in questo caso la decomposizione della materia organica è in equilibrio con la sintesi e l'accumulo della sostanza organica. Come detto precedentemente, parte del C organico ed una quantità sostanziale di N organico vengono sequestrati dalle molecole umiche, quindi si ritiene generalmente che il rapporto C/N diminuirà con l'aumento o la frequenza del processo di umificazione e si considera che il rapporto C/N tra 10 e 15 è spesso considerato essere una caratteristica del terreno che presenta acidi umici ben sviluppati (Tan, 2003).

Tabella 2.13 - Andamento dei processi di trasformazione della sostanza organica (S.O.) (Sbaraglia & Lucci, 1994)

C/N	Classificazione	Giudizio	Destino N della S.O.
< 9	Basso	Scarsa umificazione della S.O. e rapida mineralizzazione	Liberato
9 - 11	Normale	Situazione di equilibrio tra S.O. umificata e mineralizzata	Stabile
> 11	Alto	Processi di mineralizzazione pressoché nulli	Immobilizzato

A.3.4. Determinazione dell'attività enzimatica totale

Per la determinazione dell'attività enzimatica totale è stato impiegato il Diacetato di Fluoresceina (3', 6'–diacetylfluorescein [FDA]). Il Diacetato di Fluoresceina è idrolizzato da diversi enzimi, come proteasi, lipasi ed esterasi. Il prodotto di questa conversione enzimatica è la fluoresceina, che può venir rilevata da uno spettroflorimetro ed impiegata per un'analisi quantitativa della popolazione batterica (Schnürer & Rosswall, 1982).

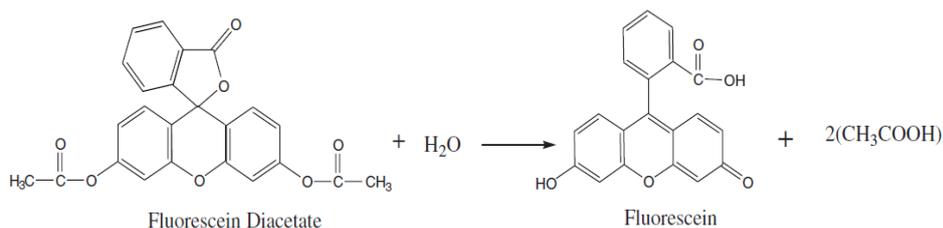



Figura 2.30 - Equazione di reazione di Diacetato di Fluoresceina idrolizzato a Fluoresceina (Schnürer & Rosswall, 1982)

Il campione è stato preparando pesando 1 g di suolo e posto in provette graduate di PoliPropilene con tappo (Falcon) da 50 ml con 20 ml di una soluzione tampone di sodio solfato (Na_2SO_4) a pH 7.6 e 0.05 ml di soluzione madre di Diacetato di Fluoresceina (avente una concentrazione di 10 µg/ml). Le Falcon sono state poste in centrifuga a temperatura costante di 24°C a 70 rpm (revolution per minute) per un tempo complessivo di 2 ore. Al termine dell'incubazione la reazione viene bloccata con l'aggiunta di acetone e, dopo centrifugazione a 4000 rpm per 5 minuti, si misura allo spettrofluorimetro la densità ottica del surnatante a 490nm.

A.4. Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici

A.4.1. Strumenti usati

La determinazione del contenuto di IPA nelle varie matrici (suolo, vegetali e lombrichi) avviene in due passaggi:

- estrazione degli IPA dalla matrice mediante estrazione accelerata con solventi;
- analisi dell'estratto in gascromatografia accoppiata a uno spettrometro di massa (detector).

Figura 2.31 - Accelerated Solvent Extractor

L'estrazione degli IPA dai campioni viene effettuata con un *Accelerated Solvent Extractor* (Dionex ASE 100). Il solvente estraente utilizzato per tutti i campioni è stato una miscela 1:1 di diclorometano (CH_2Cl_2) e acetone (C_3H_6O). Lo strumento opera ad elevati livelli di pressione e temperatura, condizioni nelle quali viene incrementato il contatto fra fase liquida e matrice ed ottimizzate le prestazioni estrattive.
L'impiego di questa macchina per ottenere l'estratto consente di utilizzare quantitativi di gran lunga inferiori di solventi, a differenza di altre tecniche (es. sonicazione, Soxhlet), con vantaggi sia economici che di impatto ambientale. La quantità di campione impiegato è limitata (ca 1 g) ed i tempi per l'intero processo sono decisamente contenuti (ca 45 min.).
Fasi operative per l'estrazione ASE:

- Preriscaldamento a 5 minuti;
- Temperature di estrazione a 140°C;
- Pressione a 100 atm;
- Cicli estrattivi, 3 cicli della durata di 10 min a ciclo. La quantità di solvente utilizzato è ca 110 - 120 ml;

- Lavaggio terminale con 20 ml di solvente.

L'estratto così ottenuto è stato quindi analizzato con un *Gas Cromatografo* (Agilent 6890) accoppiato ad uno *Spettrometro di Massa* (Agilent 5973 Inert) dotato di un autocampionatore (Gerstel MPS2).
Per meglio comprendere le fasi che portano a compimento di un'analisi, è possibile osservare lo schema seguente.

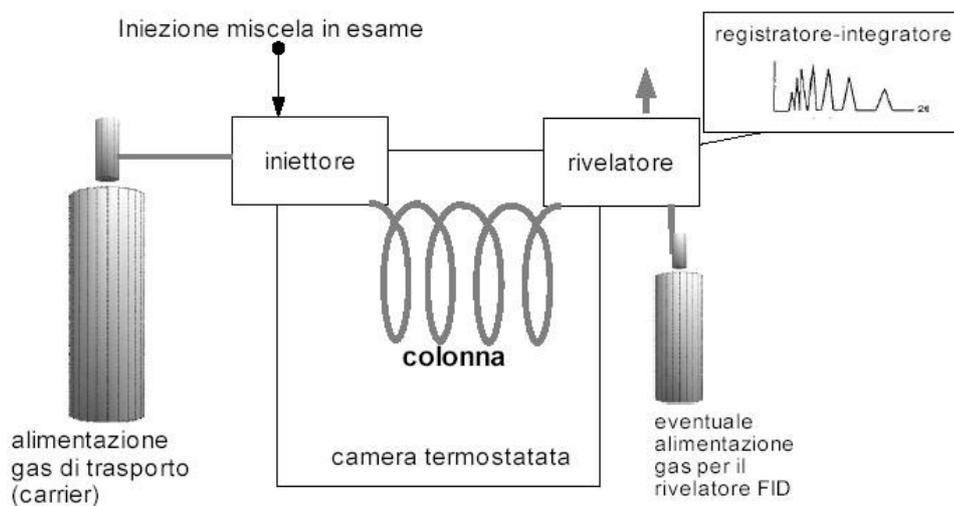



Figura 2.32 - Schema essenziale di un GS–MS

1 µl della soluzione risultante dal processo di estrazione viene iniettata tramite la siringa dell'autocampionatore nell'iniettore del gascromatografo con modalità splitless dove gli analiti vengono vaporizzati e trasportati da un flusso (*carrier*) di elio (He, 1.2mL/min) verso la colonna cromatografica. Qui i vari componenti dell'estratto si muovono a velocità diverse in funzione della loro affinità nei confronti della fase stazionaria della colonna (Agilent DB5 ms 30 m x 0.25 mm ø–0.25µm), raggiungendo così in tempi diversi il detector di massa.

Figura 2.33 - Gas Cromatografo accoppiato ad uno Spettrometro di Massa

Per ottenere una risoluzione ottimale dei picchi degli analiti monitorati è stato utilizzato il seguente programma di temperatura.

Tabella 2.14 - Programma utilizzato per la determinazione di picchi degli analiti monitorati

Temp. iniziale (°C)	**Velocità** (°C/min)	**Temp. finale** (°C)	**Hold time** (min)
55	25.00	200	0.00
200	8.00	280	0.00
280	10.00	320	2.00
320	25.00	325	5.00

Il segnale allo spettrometro di massa viene registrato sia in modalità TIC (Total Ion Counter) tra 35u e 450u che SIM (Single Ion Monitoring), la modalità SIM viene utilizzata per l'analisi qualitativa e quantitativa degli IPA, monitorando i seguenti ioni quali/quantificatori:

Tabella 2.15 - Ioni osservati mediante spettrometro in modalità Single Ion Monitoring. (T Ion, Target Ion; Q Ion, Qualifying Ion)

	deuterati			**non deuterati**	
	T Ion	**Q Ion 1**	**Q Ion 2**	**T Ion**	**Q Ion 1**
Pirene	202	200	101	212	106
Benzo[a]antracene Crisene	228	226	113	240	120
Benzo[b]fluorantene Benzo[k]fluorantene Benzo[e]pirene Benzo[a]pirene Perilene	252	253	126	264	132
Dibenzo[ah]antracene	278			292	
Indeno[123–cd]pirene Benzo[ghi]perilene	276	138		288	

Al termine del processo vi è un integratore che permette il calcolo automatico delle aree dei picchi.

L'analisi viene espressa simultaneamente in due modalità:

- *Total Ion Count* (TIC), vengono contati tutti gli ioni, nel *range* tra 35u e 450u, che raggiungono il *detector* e riportati come somma;

- *Single Ion Monitoring* (SIM), vengono monitorati un numero molto limitato di ioni caratteristici degli IPA cercati (Tabella 2.15), con conseguente incremento della sensibilità.

Lavorando con volumi non noti si deve usare lo standard interno Pirene–D (Aldrich 490695 a conc. 20ug/ml) per riferire le quantità degli analiti a un volume esatto e quindi stabilirne la concentrazione.
Il *software* è in grado di correggere automaticamente il responso strumentale degli analiti sulla base del responso effettivo del S.I. che deve essere riferito a quello impostato.
Le concentrazioni ottenute dallo strumento per ogni IPA sono state corrette considerando i recuperi dei relativi IPA-D.

A.4.2. Contaminanti monitorati

Durante questo lavoro sono stati considerati e determinati nel tempo esclusivamente gli IPA con peso molecolare più elevato.
La concentrazione degli isomeri Benzo[b]fluorantene e Benzo[k]fluorantene è espressa come la somma dei due, in quanto la risoluzione dei picchi cromatografici è risultata insufficiente a distinguerli. Da evidenziare che il limite normativo secondo il D.Lgs. 152/2006 sia per Benzo[b]fluorantene che per Benzo[k]fluorantene è 0.5 mg/Kg s.s.
Segue una tabella con IPA monitorati nelle diverse matrici, con riferimento alle Concentrazioni Soglia di Contaminazione espresse nel D.Lgs. 152/2006. Viene osservata la distinzione in relazione alla destinazione d’uso dei siti oggetti di indagine, distinti in Siti ad uso Verde pubblico, privato e residenziale e Siti ad uso Commerciale ed Industriale.

Tabella 2.16 - Concentrazione Soglia di Contaminazione nel suolo e sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso (Tab.1, colonna A, allegato 5, Parte IV, Titolo V del D.Lgs. 152/2006)

IPA monitorati	Sigla	A Siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (mg/kg ss)	B Siti ad uso Commerciale e Industriale (mg/kg ss)
Pirene	P	5	50
Crisene	C	5	50
Benzo[a]antracene	B[a]A	0.5	10
Benzo[b+k]fluorantene	B[b+k]F	0.5	10
Benzo[a]pirene	B[a]P	0.1	10
Indeno[1,2,3-cd]pirene	I[1,2,3–cd]P	0.1	5
Benzo[g,h,i]perilene	B[g,h,i]P	0.1	10
Dibenzo[a,h]antracene	D[a,h]A	0.1	10

I valori analitici osservati durante tutte le analisi sono state confrontate con la colonna A, Allegato 5, Parte IV, Titolo V, D.Lgs. 152/2006.

L'analisi quantitativa è stata condotta costruendo una retta di taratura utilizzando cinque soluzioni a diversa concentrazione per ogni IPA ricercato, considerando il *range* di concentrazioni in cui potevano cadere i campioni reali.

Tabella 2.17 - Soluzioni standard di IPA utilizzate per costruire la retta di calibrazione (Wellington L429-IS)

	st 1 conc in ug/ml	st 2 conc in ug/ml	st 3 conc in ug/ml	st 4 conc in ug/ml	st 5 conc in ug/ml
P	0.01	0.05	0.1	0.5	1
B[a]A	0.01	0.05	0.1	0.5	1
Crisene	0.01	0.05	0.1	0.5	1
B[b]F	0.02	0.1	0.2	1	2
B[k]F	0.01	0.05	0.1	0.5	1
B[a]P	0.01	0.05	0.1	0.5	1
I[1,2,3-cd]P	0.01	0.05	0.1	0.5	1
D[a,h]A	0.02	0.1	0.2	1	2
B[g,h,i]P	0.02	0.1	0.2	1	2

Nella fase di preparazione del campione vengono aggiunti 500 ng di IPA deuterati (IPA–D) (Wellington Laboratories L429–IS 1.2 μg/ml) prima dell'estrazione in ASE per la determinazione dell'efficienza estrattiva (% di recupero).

Sono stati considerati i recuperi degli IPA della fase di estrazione e concentrazione sulla base del calcolo dei recuperi degli omologhi deuterati.

Allo stesso modo che per gli IPA anche per gli IPA–D è stata costruita una retta di calibrazione utilizzando le seguenti soluzioni.

Tabella 2.18 - Soluzione IPA –D usata per i recuperi (Wellington L429-IS)

	st 1 50% (ug/ml)	**st 2 100% (ug/ml)**	**st 3 150% (ug/ml)**
naftalene-D8	0.03	0.06	0.09
acenaftilene-D8	0.03	0.06	0.09
fenantrene-D10	0.03	0.06	0.09
fluorantene-D10	0.03	0.06	0.09
B(a)antracene-D12	0.03	0.06	0.09
B(b)fluorantene-D12	0.03	0.06	0.09
B(a)pirene-D12	0.03	0.06	0.09
indeno(123-cd)pirene-D12	0.03	0.06	0.09
B(ghi)perilene-D12	0.03	0.06	0.09

Subito prima dell'iniezione in GC/MS, il campione è addizionato di 2000 ng di pirene–D (Aldrich 490490) quale standard interno.

Queste aggiunte consentono di correggere i valori di concentrazione degli IPA ottenuti dallo strumento sulla base dei recuperi osservati (ISO 12884:2000).

Per il calcolo delle concentrazioni vengono impiegate le seguenti formule:

$$[IPA]^i_{IS} = [IPA]^i_{GC} * \frac{[IS]_{GC}}{[IS]_{add}}$$

$$[IPA]^i_{corr} = [IPA]^i_{IS} * \frac{[IPA_D]^i_{add}}{[IPA_D]^i_{GC}}$$

$[IS]_{GC}$ = concentrazione di standard interno (IS) rilevata dallo strumento
$[IS]_{add}$ = concentrazione effettivamente aggiunta al campione prima dell’analisi
$[IPA_D]^i_{GC}$ = concentrazione dell’i-esimo IPA deuterato rilevata dallo strumento
$[IPA_D]^i_{add}$ = concentrazione dell’i-esimo IPA deuterato effettivamente aggiunta prima dell’estrazione
$[IPA]^i_{GC}$ = concentrazione dell’i-esimo IPA rilevata dallo strumento
$[IPA]^i_{IS}$ = concentrazione dell’i-esimo IPA corretta in funzione dello standard interno
$[IPA]^i_{corr}$ = concentrazione definitiva dell’i-esimo IPA corretta in base ai recuperi

A.4.3. Silanizzazione vetreria

La vetreria impiegata durante le fasi di preparazione del campione è stata sottoposta ad un processo di silanizzazione (dimetilclorosilano al 5% - Fluka 85126) al fine di inattivare chimicamente i gruppi ossidrilici liberi presenti nel vetro. Questi gruppi potrebbero sensibilmente determinare una sottostima degli analiti, fino a percentuali del 60 - 70% (Leon, Àlvarez, Cobollo, Muñoz, & Valor, 2003).
Precedentemente la vetreria ha subito un regolare lavaggio con detergente basico, risciacquo con acqua di rubinetto, acqua demineralizzata ed infine acetone. Al termine del lavaggio è stata posta in stufa preriscaldata a 180°C per 4 ore.

A.4.4. Preparazione dei campioni

I campioni di suolo e dei vegetali hanno subito la stessa procedura, ne segue una descrizione.
Un'aliquota di campione (setacciato a 2 mm), è stata posta in stufa pre–riscaldata a 40°C per 48 ore. È stato prelevato ca 1 g, frantumato finemente in un mortaio con un pestello, al fine di aumentare la superficie estrattiva. È stata aggiunta una quantità di sodio solfato anidro (Na_2SO_4) in rapporto 1:1 in peso con il campione per disidratarlo; è stato avvolto in un filtro di carta, inserito nella cella ASE. Sono stati aggiunti 100 µl di IPA–D (Wellington Laboratories L429–IS 1.2 µg/ml), al fine di calcolare i recuperi durante il processo estrattivo. Si pone la cella ASE nello strumento e si effettua l'estrazione alle condizioni sopra descritte.
Al termine si recuperano in media 120 ml di soluzione. Questi vengono ridotti a volumi di ca. 0.5 ml mediante evaporatore rotante (Rotavapor), con bagno termostato a 40°C.

Purificazione (Solid – Phase Extraction)

Il processo Solid–Phase Extraction (SPE) consente di rimuovere analiti che potrebbero interferire con la determinazione analitica o arrecare danno alla colonna in GC–MS.
Tale metodo sfrutta le affinità chimico–fisiche dei composti da eliminare con le proprietà della fase stazionaria posta nella colonnina SPE.

La fase stazionaria (o fase solida adsorbente), nel caso di estratti di terreno è costituita da 1 g di gel di silice (Supelco Supelclean LC–Si Spe Tube, 57051) che viene attivata con diclorometano (CH_2Cl_2). Il campione concentrato (0.5 ml) viene fatto eluire attraverso la colonnina preimpaccata con ca 10 ml di CH_2Cl_2, l'eluato riconcentrato a 0.5 ml e posto in una vial ambrata nella quale si aggiungeranno 100 µl di pirene–D (SigmaAldrich 490695) e portato ad un volume di 2 ml. Il campione così preparato è pronto per esser analizzato in GC–MS.

La purificazione dei campioni di piante differisce per la colonna di purificazione, il mezzo impiegato è stato 1 g di Florisil (60–100 smesh) (Holoubek, et al., 2000). La Florisil è stata precedentemente trattata per 4 ore a 140°C.

Il solvente e le modalità di eluizione sono analoghe al trattamento dei terreni. Anche l'eluato raccolto è stato preparato per l'analisi in GC–MS come precedentemente descritto.

A.4.5. Preparazione dei campioni di Eisenia andrei

I lombrichi sono stati attentamente prelevati dal suolo contaminato, posti in becker, puliti e lavati con acqua demineralizzata, in fine pesati. In seguito, sono stati posti in contenitori di plastica con della carta da filtro umida per 72 ore al fine di spurgarli dai contenuti di terra. Segue la procedura di preparazione dei campioni.

I lombrichi spurgati sono stati essiccati in stufa per 48 ore a 40°C.

È stato usato tutto il peso secco del campione per l'analisi in GC–MS.

Il campione secco è stato posto in mortaio e frantumato, è stata aggiunta una quantità di sodio solfato anidro (Na_2SO_4) in rapporto 1:1 in peso con i lombrichi per disidratarli. È stato posto su di un pezzo di carta da filtro, ripesato e chiuso meticolosamente. Il campione così preparato è stato introdotto nell'apposita cartuccia ASE. Sono stati aggiunti 100 µl della soluzione IPA–D (Wellington L429–IS 1.2 µg/ml).

A fine estrazione si recuperano in media 120 ml di soluzione. Questi vengono ridotti a volumi minimi di 0.5 ml con evaporatore rotante (Rotavapor), con bagno termostato a 40°C.

Saponificazione

L'estrazione in ASE con diclorometano (CH_2Cl_2) e acetone (C_6H_3O) porta in soluzione i contaminanti ma anche altri composti, come ad esempio i lipidi, che potrebbero dare delle interferenze con il metodo della gascromatografia. Per sopperire a questo problema si procede alla fase di saponificazione, seguendo il metodo descritto da Martinez et al., 2004 con alcuni accorgimenti apportati dall'Unità di Ricerca del dr. P. Barbieri (Martinez, Gros, Lacorte, & Barcelo, 2004).

L'estratto concentrato a 0.5 ml viene fatto reagire con 20 ml di NaOH 6M per un tempo di 18–24 ore. La soluzione viene posta al buio in agitazione. Questa operazione porta all'idrolisi di trigliceridi formando glicerolo e sali degli acidi grassi, entrambe le specie solubili in acqua.

Al termine, la soluzione viene posta in una Falcon da 50 ml, nella quale vengono aggiunti 20 ml di n–esano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$). Il recipiente viene chiuso, agitato vigorosamente e posto in centrifuga a 4000 rpm per circa un minuto. La fase organica si separa nettamente dal resto della soluzione che si presenta di un colore più scuro.

Con una pipetta si preleva la fase organica e la si pone in una beuta da 100 ml contenente 2 g di Na_2SO_4 anidro. Si ripete questa estrazione per altre 2 volte, aggiungendo nella Falcon 10 ml di n–esano. Infine, la fase organica viene trasferita in una bottiglia ASE e la beuta ripetutamente avvinata. In totale si ottengono 60 ml di soluzione che vengono concentrati a 0.5 ml.

Purificazione (Solid – Phase Extraction)

Si pone 1 g di Florisil in una colonna cromatografica bagnandola con $CH_2Cl_{2,}$ si pongono in seguito i 0.5 ml di campione concentrato riprendendolo sempre con $CH_2Cl_{2.}$ Si eluisce il tutto con 15 ml di CH_2Cl_2 facendo attenzione a pulire accuratamente la bottiglia ASE.

L'eluato viene raccolto in una vial ambrata, lo si concentra a circa 1.5 ml impiegando il Rotavapor e si aggiungono 100 µl di standard interno (pirene-D, Aldrich 490695). La soluzione così ottenuta viene trasferita in una vial ambrata da 2 ml, sigillata con capsula dotata di setto e posta in congelatore a –18°C in attesa di esser analizzata con GC–MS.

A.5. Test di Fitotossicità

A fianco delle indagini analitiche sui campioni per la sperimentazione in serra (2009) è stato utilizzato un saggio di tossicità al fine di ottenere un quadro degli effetti della contaminazione sulla germinazione delle piante utilizzate per il test.

Figura 2.34 – Fitotossicità, Petri con semi in pre - incubazione

Il test di fitotossicità (n. 1651 UNICHIM–2003) si basa sull'uso di semi di diverse specie vegetali al fine di determinare la potenziale tossicità dei campioni di terreno, prendendo in considerazione la germinazione e l'allungamento radicale.

Il metodo prevede l'utilizzo di semi di due dicotiledoni, il crescione (*Lepidium sativum* L.) ed il cetriolo (*Cucumis sativus* L.), e una monocotiledone, il sorgo (*Sorgum saccharatum* Moench).

Nella corso della sperimentazione è stata eliminata una specie, il *Sorgum saccharatum* Moench, in quanto non dava risultati apprezzabili.

La procedura seguita per il test è la seguente:

- sono stati pesati 10 g di terreno, precedentemente setacciato (maglia 2 mm);
- sono state determinate percentuale di umidità (U%) e capacità di ritenzione idrica (WHC);
- il campione è stato posto in piastre Petri, distribuito uniformemente e portato al 100% della sua WHC, inoltre sono stati aggiunti 5 ml di acqua demineralizzata;
- è stato posto un filtro di carta per evitare il contatto dei semi con il terreno;
- sono stati distribuiti 10 semi per piastra.

Il numero di repliche per ogni campione è pari a 4.

È stato disposto un controllo negativo ottenuto sostituendo il suolo con una soluzione di acqua demineralizzata e nutrienti (fosforo ed azoto).

Le Petri sono state chiuse in sacchetti di plastica etichettati e poste al buio per 72 ore alla temperatura di 25°C.

Al termine dell’esposizione, si contano i semi germinati e si misura la lunghezza dell’apparato radicale, quindi si calcola l’Indice di Germinazione Percentuale (IG%):

$$IG\% = \frac{G_1 L_1}{G_C L_C} * 100$$

G_1 = numero di semi germinati nel campione
G_C = numero di semi germinati nel controllo
L_1 = lunghezza radicale nel campione
L_C = lunghezza radicale nel controllo

Vi possono essere condizioni dove l’IG% si presenta maggiore rispetto al controllo negativo, che il metodo riporta sempre uguale a 100. In tal caso siamo in presenza di fenomeni di biostimolazione, ossia la matrice suolo subisce detossificazione e si osservano sensibilmente eventi di allungamento radicale. Nel caso contrario possiamo osservare fenomeni di inibizione della germinazione, ossia il suolo contaminato ha effetti inibitori sulla crescita delle radici.

Bibliografia

Adriano, D., Bollag, J., Frankenberger, W., & Sims, R. (1999). *Bioremediation of Contaminated Soil.* Ed. Agronomy.

Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry.* Academic Press.

Amato, M., Migliozzi, A., & Mazzoleni, S. (2004). *Il sistema suolo – vegetazione.* Napoli: Ed. Liguori.

Amori, G., Contoli, L., & Nappi, A. (2008). *Mammalia II. Erinaceomorpha, Soricomorpha, Lagomorpha, Rodentia.* Milano: Edizioni Calderini de Il sole 24 Ore.

Amorin, M., Römbke, J., & Soares, A. (2005). *Avoidance behaviour of Enchytraeus albidus: Effects of Benomyl, Carbendazin, phenmedipham and different soil types*. Chemosphere, 501–510.

Arnold, E., & Ovenden, D. (2003). *Field Guide of Reptiles & Amphibians of Europe.* Collins.

Ashing, J., & Marquez, E. (2010). *Dodder (Cuscuta spp.) Biology and Management (Guide A-615).* NM State University.

Bagarello, V., Di Stefano, C., Ferro, V., Iovino, M., & Mirabile, S. (2009). *Determinazione della distribuzione granulometrica del suolo mediante diffrattometria laser*. Convegno Nazionale dell'Associazione Italiana di Ingegneria Agraria.

Baker, A., & Brooks, R. (1989). *Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements* – A review of their distribution, ecology and phytochemestry Biorecovery, 1: 81-126.

Belsito, A., Fraticelli, A., Salisbury, F., & Ross, C. (1991). *Chimica Agraria.* Bologna: Ed. Zanichelli.

Benoit Van Aken, I., Paola, A., & Schnoor, J. L. (2010). *Phytoremediation of Polychlorinated Biphenyls: New Trends and Promises.* Environ Sci Technol 2010 April 15; 44(8): 2767–2776.

Boitani, L., Lovari, S., & Vigna Taglianti, A. (2003). *Mammalia III. Carnivora, Artiodactyla.* Milano: Edizioni Calderini de Il sole 24 Ore.

Bonciarelli, U., & Bonciarelli, F. (1989). *Coltivazioni erbacee.* Bologna : Calderini–Edagricole.

Boni, M., Collivignarelli, C., & Vagliasindi, F. (2011). *Siti Contaminati, esperienze negli interventi di risanamento.* Centro Studi di Ingegneria Sanitaria Ambientale.

Brady, N., & Weil, R. (2008). *The Nature and Properties of Soils 4th edition.* Pearson International Edition.

Bremner, J., & Jenkinson, J. (1969). *Determination of organic carbon in soil - I. Oxidation by dichromate of organic matter in soil and plant materials*. *J. Soil Sci. 11*, 394–402.

Briggs, G., Bromilow, R., & Evans, A. (1982). *Relationships between lipophilicity and root uptake and traslocation of non–ionides chemicals by barley*. Pestic Sci *13*, 495–504.

Brookes, P. (1995). *The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals*. Biol. Fertil. Soils *19*, 269–279.

Bulder, A. S., Hoogenboom, L., Kan, C. A., van Raamsdonk, L., Traag, W., & Bouwmeester, H. (2006). *Initial Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Feed (material).* Netherlands: Instutite of Food Safety.

Caudill, S., Turner, W., & Patterson, D. (2007). *Geometric mean estimation from pooled samples*. Chemosphere, n. 69, 371–280.

Cescon, P., & Corami, F. (2011). *Tecnologie per il trattamento di sedimenti contaminati. Atti del convegno Siti Contaminati, Esperineze negli interventi di risanamento.* Brescia.

Chhotu, J. D., & Fulekar, M. (2008). *Phytotoxicity and Remediation of Heavy Metals by Alfalfa (Medicago sativa L.) in Soil – vermicompost Media*. Advances in Natural and Applied Sciences, 2(3) 141–151.

CIGRA. (2006). *Indagine Ambientale Preliminare di completamento nell'area di proprietà provinciale situata nel comprensorio "ex–OPP" di S. Giovanni.* Trieste.

CIGRA. (2009). *Piano di Caratterizzazione Ambientale per adeguamento al D. Lgs. 152/06 per l'area di proprietà della Provincia di Trieste situata nel comprensorio "ex-OPP" di S. Giovanni.* Trieste.

Collivignarelli, C., & Vaccari, M. (2011). *Tecnologie per il trattamento di terreni contaminati, Atti di un Convegno, Siti Contaminati. Esperienze negli interventi di risanamento.* Brescia.

Commissione delle Comunità Europee. (2006). *Direttiva del Parlamento Europeo e del Consiglio che istituisce un quadro per la protezione del suolo e modifica la direttiva 2004/35/CE.* Bruxelles.

De Polli, H., Costantini, A., Romaniuk, R., & Sampaio Pimentel, M. (2007). *Choloform Fumigation – Extraction labile C pool (Microbial Biomass C "Plus") shows high correlation to microbial biomass C in Argentina and Brazilian soil.* CI. Suelo (Argentina) 25 (1) 15-22.

della Torre, C. (2009). *Valutazioni sulla sostenibilità di interventi di gestione ambientale: applicabilità del fitorimedio per l'attenuazione della contaminazione in siti inquinati e carbon footprint.* Tesi di Dottorato in Metodologie di Biomonitoraggio dell'alterazione ambientale, A.A. 2008/2009. Trieste.

Dolce, S., & Stoch, F. (1984). *Osservazioni sull'alimentazione degli anfibi: I "Triturus vulgaris meridionalis" (Boul.) degli stagni del carso triestino (Italia nordorientale)*. Estratto dagli Atti del Museo Civico di Storia Naturale - Trieste. Vol. XXXVI, Fasc. I.

Dumas, J. (1831). *Procédés de l'analyse organique*. Ann. Chim. Phys., *247*, 198–213.

EPA - Division of Water Quality. (2009). *Phytoremediation to Prevent the NPS Discharge of Gasoline Contaminated Ground Water to the Pasquotank River.* United States Environmental Protection Agency.

EPA. (2000). *Introduction to Phytoremediation, National Risk Management Research Laboratory - EPA/600/R-99/107.* United States Environmental Protection Agency.

EPA. (2004). *Report on Bioavailability of Chemical Wastes With Respect to the Potential for Soil Bioremediation.* United Stated Environmental Protection Agency.

EPA. (2005). *Ecological Soil Screening Levels.* United States Environmental Protection Agency.

Fleuren, R., Jager, T., Roelofs, W., De Groot, A., Baerselman, R., & Peijnenburg, W. (2003). *Feeding behaviour of Eisenia andrei in two different field contaminated soil*. Pedobiologia 47, 670–675.

Geosyntech. (2005). *Indagini Ambientali Preliminari ai sensi del D.M. 471/99 nell'area del comprensorio "ex-OPP" di S. Giovanni.* Trieste.

Holoubek, I., Kořinek, P., Šeda, Z., Schneiderová, E., Holoubková, I., Pacl, A., et al. (2000). *The use of mosses and pine needles to detect persisten organic pollutants at local and regional scales*. Environmental Pollution, 283–292.

IARC. (1983). Part.1, Chemical, Environmental and Experimental Data. *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals in humans, Polynuclear aromatic compounds* (p. 211). Lyon: International Agency for Research on Cancer.

Irwin, R. (1997). *Environmental Contaminants Encyclopedia – PAHs Entry.* Water Resources Division, Water Operation Branch.

ITRC. (2001). *Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance Document.* ITRC, Phytotechnologies Team. Interstate Technology & Regulatory Cooperation.

ITRC. (2009). *Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised.* Phytotechnologies Team. Washington D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council.

Jackson, M. (1964). *Clay transformation in soil genesis during the Quaternary*. Soil Sci., vol. 68, 15–21.

Johnsen, A., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). *Priciples of microbial PAH-degradation in soil*. Environmental Pollution *133*, 71–84.

Kranitz. (2004). *Caratterizzazione chimico – fisica e geologico – tecnica della scarpata a valle dell'edificio denominato pad. B del comprensorio "E. Gregoretti" sito in via Paolo De Ralli n. 1 e prospiciente via Verga a Trieste – relazione geologica e chimica.* Trieste.

Lanza, B. (2007). *Fauna d'Italia – Amphibia.* Milano: Edizioni Calderini de Il sole 24 Ore.

Leon, V., Àlvarez, B., Cobollo, M., Muñoz, S., & Valor, I. (2003). *Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: I. Method optimization*. Journal of Chromatography A. 999(1-2), 91-101.

Li, H., Luo, Y., Song, J., Wu, L., & Christic, P. (2006). *Degradation of benzo[a]pyrene in an experimentally contaminated paddy soil by vetiver grass (Vetiveria zizanioides)*. Environmental Geochemistry and Health 28, 183–188.

Liu, S., Luo, Y., Cao, Z., Wu, L., & Ding, K. (2004). *Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa*. Enviromental Geochemistry and Health 26, 285-293.

Longo, C., & Marzani, G. (2005). *Biologia Vegetale, forme e funzioni, 2th edizione.* Utet.

Loureiro, S., Soares, A., & Nogueira, A. (2005). *Terrestrial avoidance behavioir tests as screening tool to assess soil contamination*. Environmental Pollution 138, 121–131.

Luchesi, F. (2004). *Piano di caratterizzazione dell'area adiacente il cantiere per la realizzazione dei lavori di ristrutturazione dell'ex Pad. B del dismesso Ospedale per lungodegenti "E. Gregoretti" Relazione tecnica.*

Martinez, E., Gros, M., Lacorte, S., & Barcelo, D. (2004). *Simplified procedures for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediments and musses*. Journal of Chromatography A. 1047(2), 181–188.

Mickovski, S., van Beek, L., & Salin, F. (2005). *Uprooting of vetiver uprooting resistance of vetiver grass (Vetiveria zizanioides)*. Plant and Soil (2005) *278*, 33–41.

Miller, H. (1997). *The EPA's war on bioremediation. Nat Biotechnol. 1997 Jun;15(6):486.*

Minerdi, D., Moretti, M., Gilardi, G., Barberio, C., Gullino, M., & Garibaldi, A. (2007). *Bacterial ectosymbionts and virulence silencing in a Fusarium oxysporum strain*. Environ. Microbiol. 2008*; 10(7)*, 1725–41.

Nannipieri, P. (1993). *Ciclo della sostanza organica nel suolo: aspetti agronomici chimici ecologici e selvicolturali.* Pàtron editore.

Nannipieri, P., & Benedetti, A. (2003). *Metodi di analisi biochimica del suolo.* Ed. Franco Angeli.

OECD. (1984). *Guideline for testing of Chemicals no. 207. Earthworm, acute toxicity test.* Paris.

Provincia di Trieste. (2008). *L'Ospedale psichiatrico di San Giovanni a Trieste. Storia e cambiamento 1908–2008.* Ed. Electa.

Pugnaire, F., & Vallandares, F. (2007). *Functional Plant Ecology 2nd Edition.* New York: CRC Press, Taylor and Francis Group.

Qi, Y., & Chen, W. (2010). *Comparison of Earthworm Bioaccumulation between Readily Desorbable and Desorption – Resistant Naphthalene: Implication for biouptake Routes*. Environmental Science Technology 44, 323–328.

Regione Emilia–Romagna. (2004). *Disciplinari di produzione integrata. Norme tecniche di coltura, tecnica agronomica – Erba medica.*

Rentz, J. A., Alvarez, P. J., & Schnoor, J. L. (2005). *Benzo[a]pyrene co-metabolism in the presence of plant root extracts and exudates:* Implications for phytoremediation. Environmental Pollution 136.

Russel. (1986). *Il terreno e la pianta – fondamenti di agronomia.* Bologna: Ed. Edagricole.

Sbaraglia, M., & Lucci, E. (1994). *Guida all'interpretazione dell'analisi del terreno ed alla fertilizzazione.* Pomezia: Studio Pedon.

Schnürer, J., & Rosswall, T. (1982). *Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter*. Applied Environmental Microbiology 43, 1256-1261.

Schumacher, B. (2002). *Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediment.* EPA.

Semple, K., Doick, K., Jones, K., Burauel, P., Craven, A., & Harms, H. (2004). *Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated.* Environmental Science and Technology.

Sequi, P. (1989). *Chimica del Suolo.* Bologna: Ed. Pàtron.

Shuxiu, F., Peijun, L., Zongqiang, G., Wanxia, R., & Na, H. (2008). *Promotion of pirene degradation in rhizosphere of alfalfa (Medicago sativa L.).* Chemosphere 71, 1593-1598.

Singh, O., & Jain, R. (2003). *Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. Applied* Microbiology Biotechnology 63:*128–135.*

Smiley, E., Fraedrich, B., & Martin, T. (1999). *Phytophthora Root Rot and Collar Rot of Landscape Plants.* Bartlett Tree.

Soleimani, M., Afyuni, M., Hajabbasi, M. A., Nourbakhsh, F., Sabzalian, M. R., & Christensen, J. H. (2010). *Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses*. Chemosphere Volume 81, Issue 9, November 2010, 1084-1090.

Taiz, L., & Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology (3rd ed).* Sinauer Associates.

Tan, K. H. (2003). *Humic Matter in Soil and Environment – Principle and Controversies.* University of Georgia Anthens, U.S.A.: Ed. Marcel. Dekker Inn.

Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., et al. (2011). *Influence of Rhizobium meliloti on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil*. Journal of Hazardous Materials Volume 186, Issues 2-3, 28 February 2011, 1271-1276.

The World Bank. (1993). *Vetiver Grass – The Hedge against Erosion.* Washington D.C.: The World Bank.

Thompson, M. (2004). *The amazing Horwitz function - AMC Technical Brief No.17.* Royal Society of Chemistry .

Tiezzi, E., & Marchettini, N. (1999). *Che cos'è lo sviluppo sostenibile? Le basi scientifiche della sostenibilità e i guai del pensiero unico.* Roma: Donzelli Editore.

Toschi, A. (1965). *Mammalia. Lagomorpha, Rodentia, Carnivora, Ungulata, Cetacea.* Collana "Fauna d'Italia". Vol. VII. Bologna: Calderini.

Truong, P., Van, T., & Pinners, E. (2008). *Applicazione del sistema vetiver – Manuale tecnico. 2° Ed.* Vetiver Network International.

UNICHIM. (2003). Metodo n.1651 *Determinazione dell'inibizione della germinazione e allungamento radicale in Cucumis sativus L., Lepidium sativum L., Sorghum saccharatum Moench.*

University of California. (2009). *University of California Statewide Integrated Pest* Managment Program Agriculture and Natural Resource, Anthracnose.

USDA. (2007). *Alfalfa; NM Agronomy Field Note 1, JUL 2007.* United States Department of Agriculture.

Viessman, W., Lewis, G., & Knapp, J. (1989). *Introduction to hydrology.* New York: Prentice Hall.

Violante, P. (2000). *Metodi di Analisi Chimica del Suolo* (Vol. Metodo II.2; Metodo III.1; Metodo VII.1; Metodo XIII.2;). Ed. Franco Angeli.

Wang, Y., Tao, S., Jiao, X., Coveney, R., Wu, S., & Xing, B. (2008). *Polyciclic aromatic hydrocarbons in leaves cuticles and inner tissues of six species of trees in urban Beijing*. Environmental Pollution 151, 158–164.

Xia, H. (2004). *Ecological rehabilitation and phytoremediation with four grasses in oil shale mined land*. Chemosphere 54, 345-353.

Yasmin, S., & D’Souza, D. (2010). *Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review*. Applied and Environmental Soil Science, Vol. 2010, 9.

Zerbi, G., & Marchiol, L. (2004). *Fitoestrazione di metalli pesanti; Contenimento del rischio e relazioni suolo–microrganismi–pianta.* Udine: Forum - Editrice Universitaria Udinese Srl.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che hanno contribuito alla riuscita di questo lavoro.

Un ringraziamento speciale va alla cooperativa Agricola Monte San Pantaleone, che ha co-finanziato la borsa del presente Dottorato e ha sempre creduto nel progetto, incoraggiandomi ed incitandomi ad andare avanti, grazie a tutto lo staff perché davvero senza di loro non ce l'avrei mai fatta.

Ringrazio l'Unità di Ricerca in Chimica dell'Ambiente e dei Beni Culturali dell'Università degli Studi di Trieste gestita dal Dr. Pierluigi Barbieri. Un riconoscimento particolate va alla Dr. Sabina Licen, per la professionalità e la pazienza dedicatami, al Dott. Pasquale de Ceglie per il sostegno morale.

Ancora un ringraziamento speciale lo porgo alla Dr. Chiara della Torre, per aver condiviso con me ogni attimo di questa lunga avventura, per avermi sostenuta, aiutata ma in particolar modo per il suo grande cuore. Grazie ai Dr. Anna Coslovi e Luca di Monte per il supporto scientifico-sociale.

Un sincero riconoscimento va alla Prof.ssa Maria De Nobili e a tutto il suo gruppo di ricerca, alla Dott.ssa Paola Ganis per la sua disponibilità.

Ringrazio chi con me ha condiviso le nottate e i turbamenti, la Dr. Giulia Pignolo.

Infine un ringraziamento che si perde tra le righe di questa tesi va alla mia famiglia e al mio compagno, per lo smisurato amore donatomi, grazie.

Dedico questo lavoro ad Alessandro Agnolin.